

UNIVERSITÉ DE PARIS  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année Scolaie 1959-1960

# Les aspects antigéniques du plasma hétérologue despécifié

*THÈSE*

pour l'obtention  
du Grade de Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris

présentée et soutenue publiquement par

NGUYEN-TRONG Thu

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris  
Diplômé de Sérologie de la Faculté de Médecine de Paris  
Elève de l'Institut de Pharmacie Industrielle

*Membres du Jury*

Mlle S. LAMBIN, Président  
M. G. VALETTE, Examineur  
M. A. GERMAN, Examineur







UNIVERSITÉ DE PARIS  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année Scolaire 1959-1960

**Les aspects antigéniques  
du plasma hétérologue  
despécifié**

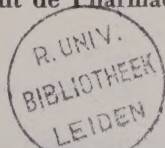
**THÈSE**

pour l'obtention  
du Grade de Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris

présentée et soutenue publiquement par

**NGUYEN-TRONG Thu**

Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris  
Diplômé de Sérologie de la Faculté de Médecine de Paris  
Elève de l'Institut de Pharmacie Industrielle



*Membres du Jury*

Mlle S. LAMBIN, Président  
M. G. VALETTE, Examineur  
M. A. GERMAN, Examineur



# PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

## ADMINISTRATION

M. René FABRE, Doyen, Membre de l'Institut  
MM. JANOT, Assesseur, G. CUVIER, Secrétaire Général  
M. L. JEANDEL, Secrétaire  
Doyen Honoraire : M. PARIS

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut ;  
LAUNOY, FLEURY, MASCRE, PICON.

## PROFESSEURS

|                                 |                                                                             |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| MM. FABRE, Membre de l'Institut | Toxicologie (T.)                                                            |
| JANOT                           | Pharmacie galénique (T.)                                                    |
| VALETTE                         | Pharmacodynamie (T.)                                                        |
| BEDEL                           | Législation, Déontologie<br>et Histoire de la Pharmacie (T.)                |
| PARIS                           | Histoire naturelle des<br>médicaments simples d'ori-<br>gine végétale (T.)  |
| GUILLOT                         | Physique (T.)                                                               |
| GAUTIER                         | Chimie organique (T.)                                                       |
| Mlle LAMBIN                     | Microbiologie (T.)                                                          |
| MM. RAOUL                       | Zoologie appliquée (T.)                                                     |
| COURTOIS                        | Chimie biologique (T.)                                                      |
| DOMANGE                         | Chimie minérale (T.)                                                        |
| CRETE                           | Botanique (T.)                                                              |
| TRUHAUT                         | Toxicologie et Hygiène<br>industrielle (T.P.)                               |
| MORETTE                         | Hydrologie (T.)                                                             |
| CAVIER                          | Parasitologie (T.P.)                                                        |
| QUEVAUVILLER                    | Hygiène (T.)                                                                |
| MOREAU                          | Pharmacie chimique (T.)                                                     |
| GUY                             | Mathématiques appliquées<br>aux sciences physiques<br>et biologiques (T.P.) |
| GERMAN                          | Technique bactériologique<br>(T.P.)                                         |
| PIETTE                          | Biologie sanguine (T.P.)                                                    |
| N                               | Chimie analytique                                                           |

## MAITRES DE CONFERENCES

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| MM. DEYSSON | Cryptogamie       |
| MALANGEAU   | Biochimie         |
| RENAULT     | Chimie organique  |
| DILLEMANN   | Biologie végétale |
| GIRARD      | Chimie analytique |



|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| MM. LARUELLE ..... | Physique            |
| LE MOAN .....      | Toxicologie         |
| ROSSIGNOL .....    | Pharmacodynamie     |
| N .....            | Pharmacie galénique |
| N .....            | Pharmacie chimique  |

#### CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

|                        |                                                             |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|
| MM. BORY .....         | Sérologie                                                   |
| CORRIEZ .....          | Physique                                                    |
| DESVIGNES .....        | Microbiologie                                               |
| GARDENT .....          | Chimie analytique (1 <sup>re</sup> année)                   |
| GESTEAU .....          | Physique biologique                                         |
| HARISPE .....          | Chimie générale et pharmaceutique                           |
| HENRY .....            | Chimie analytique (2 <sup>e</sup> et 3 <sup>e</sup> années) |
| LECLERC .....          | Chimie biologique                                           |
| Mlle LONGUEVALLE ..... | Service des examens de chimie                               |
| MM. PELLERIN .....     | Chimie analytique (2 <sup>e</sup> et 3 <sup>e</sup> années) |
| PERCHERON .....        | Chimie (4 <sup>e</sup> année)                               |
| POTTIER .....          | Pharmacie galénique industrielle                            |
| Mlle ROLLEN .....      | Biologie végétale                                           |
| M. SAVEL .....         | Parasitologie                                               |

#### INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

|                   |                                              |
|-------------------|----------------------------------------------|
| M. GOUTAREL ..... | Chef de Travaux de Pharmacotechnie galénique |
| Mlle MORIN .....  | Chef de Trav. de Pharmac. chimique           |

#### BIBLIOTHEQUE

Conservateur, chargé de la Direction : M. GARNIER  
 Conservateur : Mlle LAVAUD  
 Bibliothécaires : Mmes DESGRIPPES et KREHMER

---



A Mon Président de Thèse

Mademoiselle le Professeur S. Lambin

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie  
de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur.

A Mes Juges

Monsieur G. Valette

Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie  
de Paris

Chevalier de la Légion d'Honneur.

Monsieur A. German

Professeur à titre personnel  
Pharmacien des Hôpitaux

Qui m'ont fait le grand honneur de présider,  
d'examiner cette thèse.

Hommage respectueux et reconnaissant.



A Monsieur le Pharmacien-Commandant R. ARDRY  
Docteur d'Etat en Pharmacie, Docteur ès-Sciences Naturelles  
Chimiste des Hôpitaux Militaires, Ex Chef du Service de  
Physico-Chimie à l'Etablissement Central de Transfusion-  
Réanimation de l'Armée

Qui m'a prodigué ses conseils éclairés au  
cours de ce travail de thèse, m'a laissé  
bénéficier de ses théories en d'autres  
domaines. Hommage de profond attachement.

A Monsieur M. ROBILLIART  
Président-Directeur Général des Laboratoires Michel Robilliart

dont la bienveillance m'a permis d'entreprendre  
et de mener à bien ce travail. Hommage  
respectueux, sentiments de gratitude.

Au Centre de Recherches Biosul, et très spécialement  
A Monsieur le Vétérinaire-Commandant A. Courtin  
Diplômé de Sérologie et d'Immunologie de l'Institut Pasteur  
Ancien Directeur de l'Institut Pasteur à Nha-Trang,  
A Monsieur J. Michon  
Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris  
Diplômé de Sérologie de la Faculté de Pharmacie de Paris,  
A Madame O. Risbec  
Licenciée ès-Sciences de la Faculté des Sciences de Paris  
Précédemment attachée au Service du Fractionnement au  
Centre de Transfusion de l'Armée.

Qui m'ont conseillé et aidé dans l'exécution de  
certains de ces travaux. Sincères remerciements.



A Mes Anciens Maîtres de Paris, Saïgon, Tây-Ninh  
qui m'ont instruit depuis mon enfance

A Tous les Miens, et spécialement  
A Mes Chers Parents

qui m'ont élevé et qui ont fait beaucoup de  
sacrifices pour mes études. Pour eux, je garde  
éternellement une affectueuse reconnaissance.



## I N T R O D U C T I O N

--:--:--:--

Nul n'ignore l'importance des transfusions de sang ou de plasma dans les états de choc, de déperdition sanguine, c'est-à-dire lors des opérations, et à la suite de traumatismes accidentels ou de guerre. Présentement on dénombre en France 30 000 brûlés par an, justiciables de transfusion de plasma. Mais les sources du plasma humain sont limitées. Et si le rapport donneur-receveur ne laisse aucune inquiétude en temps normal, quant à cette thérapeutique salvatrice, ne risque-t-il point de se trouver faussé subitement ? En raison des besoins toujours plus grands et de la nécessité de constituer des réserves de plasma adaptées à ceux-ci, il serait alors nécessaire de faire appel aux succédanés plasmatiques (1).

De tout temps, on a reconnu que le problème de stockage du plasma humain était impossible, faute de donneurs. Deux pour cent seulement des individus de la population française donnent du sang (2) ; le problème devient plus crucial encore chez les races de couleur qui demeurent trop réticentes au don sanguin et pour lesquelles se superpose fréquemment un problème religieux qui ne doit pas être sous-estimé. Il faut encore noter que la grande proportion de maladies vénériennes



ou tropicales constitue en outre un grand obstacle dans l'utilisation du peu de sang collecté. Par ailleurs, on distingue actuellement plus de 1000 variétés de groupes sanguins (3), en tenant compte des multiples systèmes antigéniques connus et de la présence dans le plasma des agglutinines correspondantes, on peut constater que l'introduction de sang dans le corps d'un autre individu est loin d'être sans danger, si l'on est amené à l'effectuer de façon hâtive.

De plus, les indications thérapeutiques sont différentes pour le sang humain et le plasma. Le premier est surtout motivé par la nécessité d'un apport d'éléments figurés, alors que le second répond à trois groupes d'indications précises :

- a. correction des modifications pathologiques de la crase sanguine,
- b. apport protéique,
- c. restauration immédiate du volume sanguin.

Or, la première de ces indications représente à peine 2 % de la consommation en plasma. Compte tenu que tout emploi de plasma représente, en fait, la perte d'un emploi de sang total, on voit combien intéressant et économique serait l'emploi d'un succédané convenable.

En outre, faut-il rappeler le danger de contamination par le virus ictérigène qui grève d'environ 2 % les cas de transfusion en France, de près de 25 % en Amérique. Est-on en droit de poursuivre une thérapeutique coûteuse, non exempte



de toxicité - comme le confirment les récentes découvertes d'allergies allotypiques (\*) - alors que s'offre à nous la possibilité d'user de succédanés ?

Certains accidents mineurs, comme les réactions aux substances pyrogènes ou allergiques, ou encore l'accident grave de l'infection microbienne du liquide transfusé existent aussi bien pour le sang et le plasma que pour les substituts ; ils paraissent, en tout cas, plus facilement évitables avec ces derniers.

Le succédané apporte, en fait, les avantages suivants :

- . La possibilité d'une production illimitée, la possibilité du stockage facile d'un produit prêt à l'emploi, d'un prix de revient généralement modique,
- . La suppression de l'hépatite post-transfusionnelle et une conservation facile.

Le plasma despécifié, utilisable comme succédané du plasma, doit toutefois répondre aux exigences suivantes :

- . Rétablir rapidement la masse sanguine et assurer son maintien,
- . Etre bien toléré, ne pas donner lieu à des accidents du type pyrogénique ou toxique,
- . Etre éliminé ou métabolisé sans provoquer des lésions organiques hépato-rénales ou autres,
- . Ne pas être stocké ultérieurement par l'organisme, ne pas être antigénique,

---

(\*) A la fin de ce travail, dans la partie "Discussion des Résultats" (4).



- Etre d'administration commode, quel que soit le groupe sanguin du patient.

Des vérifications pharmacodynamiques déjà largement étudiées par divers auteurs, notamment Theilleux R., Ardry R., Coulot M. (5 à 9), ne rentreront pas dans le cadre de ce travail.

Nous nous attacherons plus spécialement à démontrer la réalité de la perte de l'antigénicité spécifique et la possibilité de l'obtention, généralement controversée, d'un produit despécifié (\*), non anaphylactique.

Nous présentons successivement dans ce travail :

- 1<sup>o</sup> Dans une première partie : l'évolution de la question, la préparation du plasma despécifié, ses caractères généraux, les caractères particuliers des plasmas traités, destinés à l'étude des critères de despécification.
- 2<sup>o</sup> Dans une seconde partie : les techniques que nous avons adoptées pour conduire nos essais personnels.

---

(\*) Le terme "despécifié" a fait l'objet de nombreuses critiques : l'abandon intégral de la structure protéique propre à une espèce étant le plus souvent mis en doute. Nous conservons néanmoins ce terme sous lequel fut désigné à la Pharmacopée le plasma bovin formolé, chauffé, nous réservant de montrer à la fin de notre travail la réalité de l'abandon des caractères antigéniques d'espèces, dans des conditions opératoires bien définies. Car, comme nous le verrons, le terme de "plasma despécifié" englobe toute une variété de produits de même origine, mais dont les compositions finales, mieux encore les structures protéiques, sont très différentes. Ceci rend compte, à notre sens, du discrédit supporté par un produit qui peut être aussi bien toxique qu'atoxique, selon les procédés de préparation.



- 3<sup>e</sup> Dans une troisième partie : les résultats expérimentaux que nous avons obtenus.
- 4<sup>e</sup> La quatrième partie fera l'objet de la discussion de ces résultats.



1<sup>ère</sup> Partie

LES PLASMAS DESPECIFIES

---



## A. EVOLUTION DE LA QUESTION

-:-:-

En 1940-41, Vangesteen, Harry, Kremen et Stevens injectèrent du sérum de bovidés à de nombreux sujets. 60 % des réactions furent défavorables et provoquèrent des chocs (10). En 1944, Lille Cordier, Duboucher et Demirleau à Tunis (11) choisirent le plasma de cheval et en perfusèrent 250 à 300 g à leurs malades avec de grandes précautions ; les incidents furent très nombreux, les accidents plus rares.

Il est incontestable, compte tenu des notions devenues classiques d'immunologie, que l'emploi du plasma animal non modifié se montre dangereux pour l'homme.

En Amérique, E.J. Cohn et Coll. (12) de l'Université de Harvard purent isoler, à l'échelle industrielle, l'albumine bovine. Il était admis que la fraction la plus toxique était constituée des globulines. L'isolement de l'albumine pouvant laisser penser que disparaîtraient les principaux inconvénients antigéniques du plasma, encore que la sérum-albumine soit elle-même antigénique. L'expérience effectuée sur des condamnés de droit commun, volontaires pour ces essais, prouva hélas la



toxicité de la sérum-albumine, même purifiée à un degré très élevé. Et l'Ecole de Harvard abandonna ses recherches dans ce domaine (1942).

A cette époque, en 1943, Neurath et coll. (13, 14, 15) ont cherché à modifier les protéines par l'emploi du chlorhydrate de guanidine et l'urée. Ils ont constaté que la protéine étudiée (la sérum-albumine bovine) conservait son antigénicité même après dialyse. L'activité immunologique ne peut pas, selon Neurath, entièrement disparaître par dénaturation de la protéine, ce que constatèrent également d'autres auteurs (16, 17). Encore ne sommes-nous pas assurés que la distinction ait été faite entre antigénicité native et antigénicité immunologique acquise lors de la désépécification.

Cependant, Massons en Espagne reprenait une méthode analogue à celle d'Edwards en Grande-Bretagne (1943), choisissant un autre procédé de dénaturation : l'action de la formaldéhyde et de la chaleur. L'action de la formaldéhyde sur les protéines, extrêmement complexe et non encore complètement élucidée, est néanmoins connue depuis longtemps. Ce fut le moyen de détoxification préconisé par Ramon à partir de 1915 (18), moyen qui fut à la base de la technique de préparation des anatoxines. Lucas, dans sa thèse de doctorat vétérinaire, parue en 1939, conseilla l'action de la formaldéhyde et de la chaleur pour détruire la toxicité du plasma bovin (19). Ch. Mérieux (20, 21, 22, 23) confirma un peu plus tard ce point de vue.



La technique d'Edwards est la suivante (24) : le sérum de boeuf est chauffé trente minutes à 70° C après addition de 0,20 pour 100 de formaldéhyde et 0,20 pour 100 d'ammoniaque. Le sérum est dilué au 1/4 ou au 1/5 pour éviter la gélification. Ce sérum "D.B.S." (despeciated bovine serum) est dépourvu d'agglutinines et d'hémolysines vis-à-vis des globules rouges humains. Sa pression oncotique serait voisine de celle du plasma humain. Le D.B.S. a été utilisé dans plus de 200 cas sans incident, d'après l'auteur.

En 1944, Mlle Cordier et Denirleau le préparent à partir de plasma équin et l'utilisent avec succès, ainsi que nous l'avons dit précédemment (11).

De son côté donc, Massons, à Barcelone (1943), prépare un plasma bovin despécifié (B.D.D.) dans des conditions voisines (25, 26). Il utilise 0,35 pour 100 de formaldéhyde, 0,1 pour 100 d'ammoniaque et chauffe au bain de vapeur jusqu'à 100°. Afin d'éviter la coagulation, il dilue de façon à arriver à une concentration en protéines de 3,7 à 4 pour 100. Après une expérimentation assez longue sur l'animal, le produit a été employé très largement en clinique humaine. Dans son rapport au IV<sup>e</sup> Congrès International de Transfusion de Lisbonne (27), Massons signale que 33 566 ampoules, soit 3 853 litres, de son "Isoplasma" ont été utilisées avec de bons résultats (1951). En mars 1954, Valdecasas (28) rapporte que 17 000 litres de ce succédané ont été, à cette date, perfusés en Espagne.



Seules, quelques réactions anaphylactiques furent notées : un cas de sensibilisation à la formaldéhyde, un syndrome urticarien et une réaction sérique. Il faut signaler, en outre, que les réactions d'ordre pyrogénique ont été inférieures à celles couramment observées en transfusion homologue. Il ajoute que les injections d'"Isoplasma" ont été renouvelées plusieurs fois chez le même malade dans 241 cas, et cela sans incident. Des adultes ont reçu jusqu'à 4000 ml en 36 heures et 5400 ml en 48 heures.

M. Coulot, dans sa thèse de doctorat en médecine (1953), a décrit la préparation d'un nouveau plasma déspecifié : l'"Hémo-plasma" (29) : le sang de boeuf est prélevé sur une solution de citrate disodique de pH 4,9. Il est centrifugé et fournit un plasma dont le pH est voisin de 7,3 à 7,4. Il subit un traitement au perhydrol qui permet d'oxyder les pigments et l'hémoglobine présents. Puis, il est dilué et formolé à la dose de 2,5 g pour mille en formaldéhyde gazeuse. La durée du formolage est de 16 heures. L'excès de réactif qui ne s'est pas fixé sur les protéines est neutralisé par une quantité judicieuse d'ammoniaque et le pH est ajusté à 7,2 - 7,3. Puis, un chauffage à la vapeur à la température de 100° C est réalisé pendant une heure. Après refroidissement, le plasma déspecifié est filtré sur filtre Seitz.

Parmi les collaborateurs de Mérieux, Hirtz (1953) (30) donne une version analogue du mode de fabrication de l'Hémo-



plasma et obtient un produit qui a déjà subi une certaine expérimentation clinique avec des résultats favorables (1952-53): Larget et Coulot (31 à 34).

Enfin, des auteurs allemands, italiens et japonais ont signalé avoir obtenu de bons résultats avec des produits préparés dans des conditions voisines de celles qui viennent d'être exposées (35 à 37)

+  
+ +

Spécialisé dans de nombreux pays sous différents noms : Isoplasma (Espagne), Adaequan (Allemagne), Hémoplasma (France), Anaplasma (Italie), Hétéroplasma (Portugal), Plasmonal (Japon), etc..., le plasma hétérologue despécifié semble être le succédané idéal du plasma humain, largement utilisable en clinique humaine (38 à 43). Cependant, la possibilité d'une rémanence d'antigénicité spécifique demeure l'objection fondamentale qui retarde son emploi en France (44).

Nous allons tenter de répondre à cette critique. Il importe, avant tout, de codifier les paramètres de préparation de ce produit, de définir exactement la matière première de fabrication, les contrôles immunologiques étant effectués par l'immuno-électrophorèse dont ont été appréciées la spécificité et la sévérité (45, 46). Car il n'est pas inutile d'insister à nouveau sur le fait qu'il peut exister de multiples produits obtenus à partir d'un même plasma originel. Toute discussion n'est donc valable qu'en distinguant sous



l'appellation commune et très générale de plasma bovin déspecifié la substance exacte issue d'un mode de préparation parfaitement et rigoureusement défini,



### B. PREPARATION DU PLASMA DESPECIFIE

-:-:-

Pendant tout le cycle de travail, on doit prendre garde à l'introduction ou à l'apparition de substances pyrogènes. La chaîne des opérations doit se terminer au plus vite pour empêcher le développement des micro-organismes de contamination. Tout le matériel entrant en préparation sera dépyrogéné par chauffage à 250°, pendant 30 minutes au moins. A défaut d'un tel chauffage, on lave soigneusement les instruments, les rinçant avec de l'eau privée de pyrogènes et les stériliserà à l'étuve à 150° C - 160° C pendant 2 heures au moins (47). En outre, on se gardera au mieux d'hémolyser le sang prélevé.

#### Solution anticoagulante.-

Pour minimiser le risque de pyrogènes, la solution anticoagulante se prépare extemporanément, à partir d'acide et de base selon la formule suivante (\*):

---

(\*) En effet, le citrate de sodium pouvait être facilement contaminé par des micro-organismes alors que les pH des acides et bases libres n'autorisent généralement pas le développement de ceux-ci.



Acide citrique ..... 25,72 g  
Hydroxyde de sodium ..... 97,90 g  
Eau fraîchement distillée qsp 1000

#### Récolte de sang.-

On se sert de flacons de 10 litres, jaugés, dépyrogénés, contenant chacun 1 litre de solution anticoagulante. A ces flacons, on adapte des dispositifs pour la récolte aseptique du sang et l'on stérilise le tout à l'autoclave à 120° C durant 20 minutes. La récolte se fait par ponction des veaux à la jugulaire, le matin à jeun pour éviter une forte lipémie et après badigeonnage à la teinture d'iode. On obtient ainsi un sang dont la concentration finale en citrate disodique anhydre est de 2,90 g % environ.

#### Séparation du plasma.-

On emploie le centrifugeur pour travail aseptique, en l'occurrence l'Electro-Ecrémeuse Type SH3 (125 w, 110 v, débit horaire : 8 à 10 litres de sang). On prend soin de dépyrogéniser au préalable le bol séparateur. Avant de faire arriver le sang citraté dans l'appareil, on laissera passer d'abord un litre de solution de  $\text{ClNa}$  à 9 %, ceci afin d'éviter précisément l'hémolyse lors de l'arrivée de sang à l'intérieur d'un bol vide en pleine rotation. On obtient ainsi un plasma dont le pH est  $7,3 \pm 0,1$ .

#### Peroxydation.-

Après avoir dosé, par le protocole d'Ardry et Storck



(voir chapitre suivant), l'hémoglobine plasmatique provenant des faibles traces d'hémolyse, on ne laisse entrer dans la fabrication que les plasmas ayant un taux d'hémoglobine inférieur à 0,2 g %. Le perhydrol (p), utilisé pour oxyder les traces de pigments, est ajouté à raison de 1 % du volume final (n') :

$$p = 0,01 \text{ n'} \quad (\text{I})$$

On mélange 1 partie de perhydrol à 100 parties de plasma citraté et l'on agite continuellement environ 1 heure jusqu'à ce qu'il ne reste plus d'eau oxygénée.

Cette vérification s'effectue à l'aide de la réaction à l'acide perchromique effectuée en mélangeant les réactifs suivants et en agitant avec précaution :

- . Filtrat trichloracétique à parties égales .... 2 ml
- . Acide sulfurique officinal ..... 2 ml
- . Ether ..... 2 ml
- . Solution de dichromate de potassium 1 % ..... 1 goutte

Si la couche étherée prenait une coloration bleue, on pourrait conclure à la présence d'eau oxygénée.

#### Formulation.-

Après avoir dosé les protides totaux du plasma citraté brut, par la méthode de biuret (voir chapitre suivant), on calcule les quantités de diluants à ajouter pour obtenir finalement un plasma contenant 50 g pour mille de protéines.

Les diluants sont constitués par :



- . Le soluté concentré d'eau oxygénée ( $p$  = perhydrol) employé à la concentration de 1 pour 100 du volume final.
- . Le soluté officinal de formaldéhyde ( $f$ ), employé tel que la concentration finale en aldéhyde formique gazeux soit de 3,50 g pour mille du volume final. Comme le soluté est à 35 % en aldéhyde formique gazeux, on l'emploie à 1 % du volume final.
- . Le soluté aqueux de  $ClNa$  à 9 % ( $\phi$ ), servant de diluant principal avant formolation (voir son calcul plus loin) ; pratiquement, on mélange  $f$  et  $\phi$  et l'on ajoute l'ensemble au plasma citraté, de manière que dilution et formolation soient simultanées.
- . Le soluté d'ammoniaque officinal ( $a$ ) employé à la dose correspondante aux  $5/3$  de la quantité de formol résiduel.

Donc, soit  $n$  le volume en ml de plasma citraté de départ, ayant un titre en protéines  $T$ . Le volume  $n'$  du plasma déspecifié titrant 50 g % sera connu par cette formule :

$$nT = n' \cdot 50$$

$$n' = 1/50 \, nT = 0,02 \, nT \quad (II)$$

Ecrivons que  $f$  est égal à  $n'/100$  :

$$f = 0,01 \, n' \quad (III)$$

On mélange donc  $\phi$  et le volume de formaldéhyde  $f$  à la quantité  $n$  de plasma, et on laisse la formolation se faire à 20° C pendant 16 heures en maintenant une agitation continue.



### Neutralisation du formol résiduel.-

La plus grande partie de la formaldéhyde se fixe sur les protéines, la partie résiduelle (r), connue par dosage (voir chapitre suivant), est neutralisée par addition d'ammoniaque (a).

Ecrivons que (a) est égal à  $5r/8$  et l'expérience montre que ce volume est sensiblement égal à 0,003 n' :

$$a = 5r/8 \quad \# \quad 0,003 \text{ n'} \quad (\text{IV})$$

On ajoute donc (a) et l'on maintient le contact pendant 1 heure tout en agitant.

### Chauffage.-

Le pH du mélange ne devant pas dépasser 7,2, on procède alors à un chauffage à l'autoclave à 110° C pendant 20 minutes, ce qui correspond à une réelle stérilisation sans pour cela, dans les conditions précitées, provoquer une hydrolyse des protéines.

Pour des fabrications importantes dont la contenance de chaque récipient dépasse 10 litres, il importerait de pratiquer cette opération en cuve en acier inoxydable finement polie à l'intérieur, munie d'un agitateur passant à travers le couvercle, chauffable à la vapeur par double paroi à l'extérieur. L'agitation est nécessaire dans ce cas pour bien répartir l'action de la chaleur.

### Filtration.-

Après un repos de 24 heures et après une filtration dé-



grossissante, on procède à une filtration dépyrogénante sur filtre presse de Seitz avec plaques stérilisantes EHS II. Le plasma despécifié est alors stocké dans des réservoirs dépyrogénés jusqu'au moment de la charge en flacons "type transfusion". On doit penser à réchauffer le plasma vers 70° C avant de filtrer car il est moins visqueux à chaud qu'à froid (48).

#### Tyndallisation.-

La charge se fait sous hotte à rayons ultraviolets ; les flacons dépyrogénés sont obturés par des bouchons en caoutchouc neutre apyrogène.

On annexe à ces flacons de petites ampoules de 1 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié dilué au 1/5, destinées à pratiquer les ophtalmoréactions avant chaque emploi.

Le cycle de préparation est terminé par une tyndallisation de 3 fois à 70° C pendant 1 heure.

#### Récapitulation.-

Inspirée essentiellement de l'ensemble des travaux d'Ardry (49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56), la préparation est définie par ces différentes équations :

- . Le volume du plasma citraté brut ..... n
- . Le volume du plasma despécifié au final ...  $n' = 0,02 nT$
- . Le volume du perhydrol .....  $p = 0,01 n'$
- . Le volume du soluté de formaldéhyde .....  $f = 0,01 n'$
- . Le volume de l'ammoniaque .....  $a = 5/8r\#0,003 n$
- . Le volume du soluté de ClNa .....  $= n' - (n + p + f + a)$



## C. CARACTERES GENERAUX DU PLASMA DESPECIFIE

-:-:-

Avant de discuter de l'importance de la matière première de fabrication et des tests immunologiques, il importe de préciser les critères du produit que nous visons à obtenir.

Ces critères serviront de points de repère, ce qui permettra une comparaison significative. Nous nous baserons sur un rapport présenté à la Commission permanente du Codex.

### Définitions.-

Le plasma despécifié est du plasma bovin qui a perdu la presque totalité des caractères antigéniques primitifs et qui peut désormais être utilisé comme substitut du plasma humain.

Il est obtenu le plus généralement par traitement au moyen de l'aldéhyde formique à chaud, de 90° C à 105° C, ce qui modifie les protéines natives en les transformant en protéines thermosolubles de point isoélectrique égal à  $4,2 \pm 0,2$ .

### Caractères.-

C'est une solution opalescente, jaune ambré ou verdâtre,



possédant un effet Tyndall marqué et pouvant présenter, comme les sérums thérapeutiques et lors de la conservation, un léger précipité se déposant lentement au fond du récipient.

ESSAIS.- Les essais comportent :

1. La mesure du pH.- Le pH mesuré au moyen de l'électrode de verre doit être compris entre pH 7 et 8.

2. Le dosage des protéines.- La quantité de protéines totales, par litre, doit être égale à  $50 \pm 2$  g. Elle sera déterminée par la méthode pondérale après coagulation par l'alcool à 95° chaud. La prise d'essai étant de 3 ml, le poids de protéines précipitées et séchées à poids constant doit être compris entre 144 et 156 mg

3. Le dosage du chlorure de sodium effectué sur 5 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié, ajoutés dans un Bocher, à 10 cm<sup>3</sup> de solution décinormale de nitrate d'argent (R), 3 cm<sup>3</sup> de solution de permanganate de potassium à 3 % (R) et 4 cm<sup>3</sup> l'acide nitrique officinal. On porte à ébullition avec précaution, pour éviter toute projection, et on laisse bouillir jusqu'à ce que la fin du précipité soit blanc. Ayant refroidi, on ajoute 10 à 15 cm<sup>3</sup> d'eau distillée et 0,5 cm<sup>3</sup> de solution d'alun de fer (R), puis, goutte à goutte, une solution décinormale de thiocyanate de potassium (R). La quantité de thiocyanate ajoutée doit être comprise entre 2 et 3,2 cm<sup>3</sup> (chlorure de sodium par litre : 7 à 9 g.).

4. Recherche de l'hémoglobine.- Pour effectuer cette



recherche, il faut préparer les réactifs suivants :

|             |                      |                     |
|-------------|----------------------|---------------------|
| Réactif (a) | Pyridine (R) .....   | 9 cm <sup>3</sup>   |
|             | Résorcine .....      | 1 g                 |
|             | Amidopyrine .....    | 5 g                 |
|             | Alcool à 95° qsp.... | 100 cm <sup>3</sup> |

|             |                                   |                     |
|-------------|-----------------------------------|---------------------|
| Réactif (b) | Acide acétique cristallisable (R) | 8 cm <sup>3</sup>   |
|             | Alcool à 95° .....                | 100 cm <sup>3</sup> |

A 0,5 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié, on ajoute successivement 2 cm<sup>3</sup> du premier réactif et 1,5 cm<sup>3</sup> du second, puis 1 cm<sup>3</sup> d'eau oxygénée à 0,6 % obtenue par dilution extemporanée de la solution d'eau oxygénée (R). On mélange et filtre après 45 minutes de contact : le filtrat ne doit pas présenter de coloration rose carminé stable.

5. Le dosage de l'aldéhyde formique consiste à acidifier 30 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié par 3 cm<sup>3</sup> d'acide trichloracétique en solution aqueuse à 20 %, puis, après avoir filtré ou centrifugé, à neutraliser le liquide clair par addition de lessive de soude (R), puis à pratiquer le dosage de la formaldéhyde. Le nombre n de cm<sup>3</sup> de solution de thiosulfate de sodium employé doit être supérieur à 14 (aldéhyde formique libre inférieure à 0,3 g par litre).

6. La recherche des protéines non modifiées nécessite la préparation du réactif suivant qui doit posséder un pH de 4,2 :

|                                            |                     |
|--------------------------------------------|---------------------|
| Solution normale d'hydroxyde de sodium ... | 50 cm <sup>3</sup>  |
| Acide acétique cristallisable .....        | 7,2 cm <sup>3</sup> |
| Eau distillée .....                        | 300 cm <sup>3</sup> |



A 30 cm<sup>3</sup> de ce réactif, on ajoute un cm<sup>3</sup> de plasma despécifié, on porte une heure à l'étuve à 37° C et on filtre. Le filtrat ne doit pas précipiter par la solution d'acide trichloracétique (E) (Protéines non modifiées).

7. Le test d'anaphylaxie consiste à injecter par voie intrapéritonéale à dix cobayes de 250 à 500 g deux cm<sup>3</sup> de plasma despécifié dilué au 1/25. Après 4 semaines, on pratique l'injection déclenchante en injectant un cm<sup>3</sup> de plasma despécifié dans la veine saphène externe : au maximum, 20 % des animaux pourront présenter des réactions anaphylactiques discrètes (gêne visible, prurit léger au museau).

8. Le test de stérilité.- Ensemencer 1 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié dans des tubes contenant 20 cm<sup>3</sup> de milieu au thioglycolate permettant la recherche des bactéries aérobies et anaérobies. Aucun développement microbien ne doit être observé après sept jours de séjour à 37° C.

L'ensemencement sur milieu liquide de Sabouraud permet de rechercher la présence de champignons inférieurs.

9. La recherche des substances pyrogènes.- L'absence de substances pyrogènes dans l'eau distillée ou les solutés aqueux se vérifie en injectant un certain volume de ces préparations à des lapins. Ceux-ci ne doivent pas présenter d'hyperthermie dans les conditions fixées au Codex (52).

10. La Toxicité.- On injecte 0,5 cm<sup>3</sup> de plasma despécifié dans la veine latérale de la queue de cinq souris, mâles de



préférence ou femelles non gravides, pesant de 18 à 25 g. Si tous les animaux survivent au moins 48 heures, le produit peut être considéré comme non toxique.

#### INDICATIONS.

Toutes les indications de la plasmathérapie conviennent. Le plasma despécifié peut être employé à titre prophylactique préopératoire et à titre thérapeutique dans le traitement d'états de choc de natures très diverses, notamment opératoires, hémorragiques, traumatiques, mixtes, toxiques (chez les brûlés, en cas de toxicoses des nourrissons).

Le plasma despécifié est contre-indiqué chez les sujets présentant une ophtalmoréaction positive, c'est-à-dire présentant une hyperthermie conjonctivale avec sensation de cuisson passagère au maximum 15 minutes après instillation dans le sac conjonctival inférieur de quelques gouttes de plasma despécifié dilué au 1/5 avec une solution de chlorure de sodium isotonique.

#### REMARQUES.

Les méthodes de contrôle précitées visent à être classiques, ne nécessitant aucun appareillage spécial.

D'autres caractères physico-chimiques ont été rapportés par Storck (59) :

- . Point cryoscopique : -0° 59 (plasma natif : -0° 57)
- . Tension superficielle : 63 dynes/cm<sup>2</sup> (plasma natif : 59 dynes/cm<sup>2</sup>)



- . Viscosité relative : 1,8 (plasma natif : 1,4)
- . Pression osmotique relative : 65 à 70 p. 100 de la pression osmotique des protéines natives.
- . Electrophorèse : un seul bloc protéique à vitesse de migration plus rapide que l'albumine.

Ces caractères découlent d'ailleurs d'un mode de préparation très général, les modifications d'ordre immunologique dépendant surtout de légères variations de paramètre température et surtout, comme nous le verrons, d'un paramètre omis par tous les auteurs antérieurs, à savoir l'âge de l'animal donneur de plasma.



D. CARACTERES PARTICULIERS DES PLASMAS TRAITES,  
DESTINES A L'ETUDE DES CRITERES DE DESPECIFICATION

-:-:-

Nous rappelons que notre étude tient pour acquis les taux de protéines, de formaldéhyde, d'ammoniaque cités lors du mode général de préparation, notre étude tendant spécialement à démontrer l'influence de la température de chauffage.

Douze plasmas ont été fabriqués pour l'expérimentation : d'une part, sont conservés en référence les plasmas natifs de boeuf et de veau et, d'autre part, les mêmes plasmas sont des-pécifiés selon le protocole précédemment donné, mais à ces différentes températures : 57°, 67°, 77°, 87°, 110° C. Les boeufs ponctionnés sont âgés de 6 ans environ, les veaux de 2 mois.

Le choix a été fixé sur la race bovine pour différentes raisons : le boeuf vivant peut donner jusqu'à 8 litres de sang tous les 10 jours sans accident, on pourrait aussi en trouver dans les abattoirs des grandes villes avant l'abattage. La race chevaline n'est pas retenue, car le cheval est l'animal producteur des sérums thérapeutiques (antitétaniques, anti-



diphtériques, etc...), et l'on comprend facilement les risques toujours possibles de choc en cas de transfusion d'un plasma chevalin mal désanaphylactisé (\*).

D'ailleurs, hors les essais de Cordier, les tentatives d'emploi du plasma équin se sont soldées par de tragiques incidents. En outre, le taux des protéines totales est très voisin chez l'homme et le boeuf (60), la masse moléculaire de la sérumalbumine est identique dans les deux espèces et égale à 69 000 (61), la composition en acides aminés des fractions albuminiques bovine et humaine est extrêmement voisine (62).

Les températures de despécification ont été choisies d'après les travaux précédents de R. ARDRY montrant le mécanisme de despécification à différents paliers thermiques (63).

---

(\*) Nous avons confirmé tout à la fois l'intolérance au plasma despécifié de cheval (PDC) et la supériorité du plasma despécifié de veau (PDV) sur le plasma despécifié de boeuf (PDB) dans une expérimentation récente (Octobre 1959). Ces plasmas furent injectés à des rats dont les reins furent ensuite étudiés sur le plan anatomo-pathologique. Les différences significatives observées par Mr DE BRUX (Professeur Agrégé d'anatomie pathologique, à qui vont nos remerciements) sont les suivantes :

Rats injectés de PDC : Lésions glomérulaires, multiplication très marquée des éléments endothéliaux du capillaire, multiplication cellulaire autour des artérioles pré-glomérulaires, certaines artérioles sont entourées par une mince gaine d'éléments inflammatoires, certains de ces vaisseaux montrent même des cellules dans leurs parois.

Rats injectés de PDB : Petites lésions plus focales que généralisées.

Rats injectés de PDV : aspect normal.



Nous avons, en sur plus, constaté qu'elles marquaient le plus généralement des points d'inflexion dans les courbes d'évolution d'antigénicité que nous serons appelés à discuter.

Pour les températures de désanaphylactisation allant de 57° C à 87° C, le chauffage a été pratiqué au bain-marie, le plasma étant placé dans des flacons type transfusion, de 250 ml, plus hauts que larges, dans le but d'avoir une température aussi égale que possible à l'intérieur des flacons, pendant le chauffage.

Ces flacons mesurent 150 mm de haut, ont un diamètre de 65 mm, ils sont remplis à 200 ml, hermétiquement bouchés au moyen de bouchons de caoutchouc et capsulés au pas de vis.

Le bouchon laisse passer un thermomètre de contrôle. Le chauffage est fait rapidement en 4 à 5 minutes, à la température désirée que nous maintenons pendant 20 minutes au moyen d'un bain-marie réglé à  $\pm 1^{\circ}$  C.

Pour la température de 110° C, le chauffage fut pratiqué dans l'autoclave, avec les mêmes soucis.

Le problème de conservation des plasmas despécifiés se résoud de lui-même. Mais, durant les travaux d'immunisation et d'études, tant biologiques, sérologiques qu'immunologiques, il n'en est pas de même pour les plasmas natifs. Pour ceux-ci, nous avons pris des précautions particulières.

Leur conservation fut assurée par lyophilisation, dans des flacons de 3 ml remplis à 0,5, sur appareil SECKUL, sous



un vide de 10 mm de mercure, à -100° C. Les plasmas natifs ont été, au préalable, dilués avec de l'eau physiologique afin de les ramener à une concentration uniforme en protéines de 50 g par litre.

Nous désignerons ces douze plasmas comme suit :

Bn = plasma de boeuf natif  
B57 = plasma de boeuf despécifié à 57° C  
B67 = plasma de boeuf despécifié à 67° C  
B77 = plasma de boeuf despécifié à 77° C  
B87 = plasma de boeuf despécifié à 87° C  
B110 = plasma de boeuf despécifié à 110° C

Vn = plasma de veau natif  
V57 = plasma de veau despécifié à 57° C  
V67 = plasma de veau despécifié à 67° C  
V77 = plasma de veau despécifié à 77° C  
V87 = plasma de veau despécifié à 87° C  
V110 = plasma de veau despécifié à 110° C.



2<sup>ème</sup> Partie

TECHNIQUES D'INVESTIGATIONS

P E R S O N N E L L E S

---

Nous examinerons successivement :

- A. Le mode de préparation des immunosérums.
- B. La technique d'ultramicro-immunoélectrophorèse.
- C. La méthode de dosage des hexosamines liées aux glycoprotéines restant après la desspécification.
- D. La méthode de microdosage des sucres réducteurs libérés pendant la desspécification.
- E. La technique de la réaction de déviation de complément du type Kolmer.



## A. PREPARATION DES IMMUNSERUMS

-:-:-

La préparation des immunosérums a été faite sur lapins selon la technique citée par Grabar (64). Les douze plasmas à étudier sont additionnés séparément d'alun de potassium en solution à 1 % dans l'eau physiologique, à raison de 1 ml pour 100 mg de protéines. La solution est neutralisée par la soude. Le précipité d'alumine, formé in situ, adsorbe les protéines. La suspension obtenue est injectée à des lots de 4 lapins, sains, pesant environ 2 kg.

Les injections sont faites dans la veine marginale de l'oreille, au rythme suivant :

1ère semaine : 2 injections de 10 mg de protéines par injection  
2ème semaine : 3 injections de 20 mg de protéines par injection  
3ème semaine : 3 injections de 30 mg de protéines par injection  
4ème semaine : 3 injections de 40 mg de protéines par injection

Huit jours après la dernière injection de la 4ème semaine, les lapins qui ont survécu subissent une ponction à la carotide. On prélève 20 ml de sang pour les observations sérologiques et immunologiques.



Le protocole précédent a le désavantage insigne de provoquer de nombreux chocs. Par tâtonnements, nous avons réussi à obtenir une sensibilisation satisfaisante sans phénomène toxique :

En 30 jours, nous avons procédé à 15 injections intraveineuses sensibilisantes à 12 lots de 4 lapins de 2 kg environ, une injection tous les 2 jours; chaque injection contient 5 mg de protéines adsorbées par un précipité d'alumine. Cette dose suffisamment sensibilisante ne doit provoquer aucun résultat anormal pour les deux séries de plasma Boeuf et Veau.

33 jours après la 1ère injection sensibilisante, nous avons procédé à une 1ère injection déchaînante à 100 mg de protéines aux 12 lots de lapins. Nous constatons :

- Chez les lapins ayant reçu du plasma de boeuf et immédiatement après la 1ère injection déchaînante :
    - . un choc mortel sur 100 % des lapins ayant reçu Bn
  - 5 minutes après la 1ère injection déchaînante :
    - . un choc mortel sur 50 % des lapins ayant reçu B57
  - 3 jours après la 1ère injection déchaînante :
    - . une syncope mortelle sur 50 % des lapins ayant reçu B77.
- Par contre, chez les lapins ayant reçu du plasma de veau :
- . rien d'anormal n'est à signaler.

63 jours après la 1ère injection sensibilisante, nous avons procédé à une 2ème injection déchaînante de 500 mg de protéines aux lots de lapins restant en expérience :



Nous ne constatons rien d'anormal.

93 jours après la 1ère injection sensibilisante, nous avons procédé à une 3ème injection déchaînante à 750 mg de protéines aux lots de lapins restant en expérience jusqu'à ce jour, soit 5 mois après la 1ère injection déchaînante :

Nous ne constatons rien d'anormal.

Il est à remarquer que cette 3ème injection déchaînante correspondrait à une transfusion chez l'homme, elle a été faite volontairement rapide en 15 minutes. En effet, un homme moyen de 70 kg supporte une transfusion de 500 ml de plasma à 60 g pour mille, soit 25 g de protéines. Un lapin de 2 kg, pesant donc 35 fois moins, supporterait une transfusion de  $25/35$  g de protéines, soit 714 mg. Nous en avons injecté 750 mg.

Ces résultats généraux sont récapitulés dans le tableau I. Comme on peut le constater, cette préparation des immunosérums constitue déjà une première exploration qui nous offre des résultats d'ordre physiologique certes insuffisants, mais déjà favorables à l'emploi préférentiel du plasma de veau.



TABIEAU I

Phénomènes observés au cours de la préparation  
des immunsérums.

| Protocole<br>d'expérimentation                           | Résultats<br>chez le boeuf                                                                                                                                                                                                            | Résultats<br>chez le veau |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| en 30 jours :                                            |                                                                                                                                                                                                                                       |                           |
| 15 injections sensibilisantes à 5 mg de protéines        | rien d'anormal                                                                                                                                                                                                                        | rien d'anormal            |
| le 33e jour :                                            | <ul style="list-style-type: none"><li>- Immédiatement :<br/>choc mortel sur Bn<br/>(100 %)</li><li>- 5 minutes après :<br/>choc mortel sur B57<br/>(50 %)</li><li>- 3 jours après :<br/>syncope mortelle sur<br/>B77 (50 %)</li></ul> |                           |
| 1ère injection déchaî-<br>nante à 100 mg de<br>protéines | rien d'anormal                                                                                                                                                                                                                        | rien d'anormal            |
| le 63e jour :                                            | rien d'anormal<br>sur les ani-<br>maux restants                                                                                                                                                                                       | rien d'anormal            |
| 2e injection déchaî-<br>nante à 500 mg de<br>protéines   |                                                                                                                                                                                                                                       |                           |
| le 93e jour :                                            |                                                                                                                                                                                                                                       |                           |
| 3e injection déchaî-<br>nante à 750 mg de<br>protéines   | rien d'anormal                                                                                                                                                                                                                        | rien d'anormal            |

Bn : lapins ayant reçu du plasma bovin natif.

B57 : lapins ayant reçu du plasma de boeuf despécifié à 57° C.

B77 : lapins ayant reçu du plasma de boeuf despécifié à 77° C.



B. MISE AU POINT DE L'ULTRAMICROMETHODE  
D'IMMUNO-ELECTROPHORESE

-:-:-

1. Principe.- Le principe en est maintenant bien connu : après l'électrophorèse en gélose, on laisse diffuser l'immunsérum dans une gouttière parallèle à l'axe de la migration électrophorétique. On retrouve ainsi le principe de la technique d'Ouchterlony où les antigènes se trouveraient alignés sur un axe (axe de migration), parallèle au réservoir d'anticorps, ceux-ci étant mélangés et répartis tout au long de la fente. Chaque antigène, en diffusant radialement autour de son origine, va rencontrer son anticorps homologue qui diffuse latéralement. Il se forme ainsi une série de précipités dont les arcs paraboliques (dans le cas idéal) se comporteront comme des systèmes indépendants dans les boîtes d'Ouchterlony : les lignes vont se couper (\*).

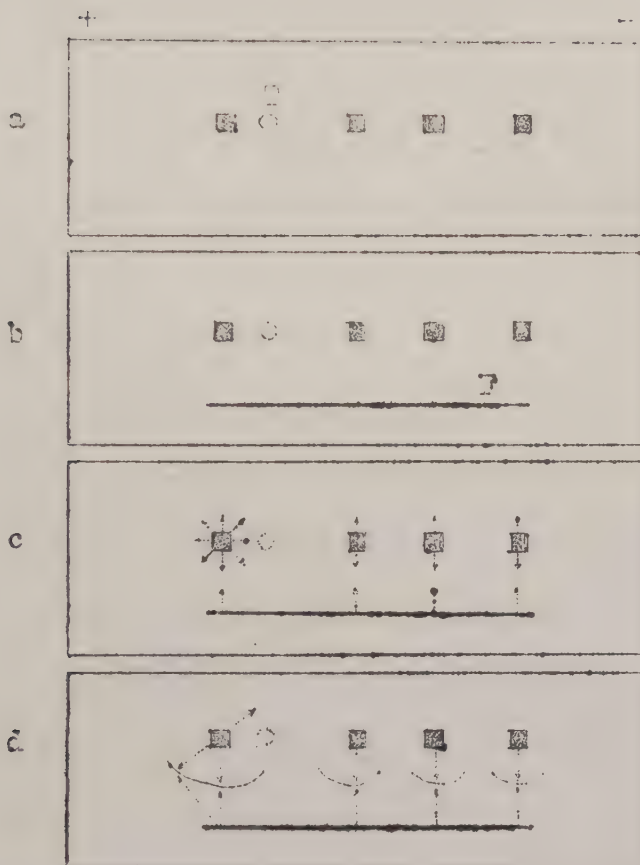
Si l'électrophorèse simple est la méthode analytique de contrôle courant pour suivre le comportement des albumines et

---

(\*) Voir "Représentation schématique de l'ultramicro-immuno-électrophorèse".



# REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ULTRAMICRO-IMMUNOELECTROPHORESE



- a. L'électrophorèse a séparé les fractions du mélange d'antigènes déposé en T.
- b. On ajoute l'immunsérum anti-"antigène" dans la fente F.
- c. Le mélange d'antigènes et l'immunsérum diffusent dans tous les sens.
- d. A la rencontre des lignes de diffusion correspondant aux zones d'équivalence, il y a précipitation spécifique entre l'antigène et son anticorps.



globulines plasmatiques après la despécification, l'immuno-électrophorèse est la méthode de choix pour le contrôle de l'antigénicité d'un plasma despécifié. L'immuno-électrophorèse permet, en une seule fois, une double identification des protéines ; elle fournit d'abord des renseignements basés sur la mobilité électrophorétique, puis une identification des fractions antigéniques par précipitation avec des immunsérums.

Ce principe a été décrit en 1953 et en 1954 par Grabar (65). Les détails techniques de la microméthode ont été précisés en 1958 (66). Entretemps, une microméthode a été proposée par Scheidegger (67).

Nous avons travaillé sur une ultra-microméthode personnelle (68) ne nécessitant pas l'emploi d'un tampon circulant, donc plus commode, permettant de gagner considérablement de temps (12 heures contre 7 jours pour un cycle complet de travail), ce qui évite la multiplication microbienne et donne plus de finesse dans la lecture des résultats. L'appareillage a été fabriqué par nous-mêmes.

## 2. Appareillage.-

Bac d'électrophorèse : c'est un récipient en matière plastique se trouvant dans le commerce. Les deux parois longitudinales sont percées d'un trou de 3 mm de diamètre, deux fiches femelle de radioélectricité courante sont mises en place, enserrant deux électrodes en platine de section 5/10 mm, de longueur 25 mm (fig. 1). Les cases A et B reçoivent



vent chacune 250 ml de tampon au véronal. Le bac est recouvert d'une plaque de verre double 22 x 36 cm accompagnée d'une feuille en matière plastique noire de mêmes dimensions.

Redresseur : Le courant continu s'obtient par la lampe électronique EZ 80, à la sortie de laquelle on peut espérer avoir 80 mA sous 150 v. Au détriment des redresseurs secs, cette lampe donne un courant continu idéal, ne possédant pas les inconvénients du courant inverse (fig. 2). Ce redresseur doit être accompagné d'un voltmètre pour la zone 40 v, ou d'un appareil de mesure.

Guide perforateur : Trois blocs de Lucoflex (matière plastique rigide) comportant chacun un trou cylindrique dans le sens vertical. Ils enserrant deux lames de rasoirs et sont serrés par deux traverses de boulons (fig. 3). On joint à cet appareil une aiguille à injection de longueur 50 mm, diamètre extérieur 8/10 mm, meulée coupante suivant sa section droite, branchée sur trompe à vide.

Trois boîtes en matière plastique : Ces boîtes peuvent s'acquérir aisément (fig. 4). La première sert de chambre humide : ses deux petites parois portent deux chevalets en verre, les deux autres et la surface intérieure du couvercle sont tapissées de papier Arche 302, elle contient 50 ml d'eau merthiolatée. La deuxième sert de boîte à coloration, contenant 50 ml de solution Amidoschwartz. La troisième sert de boîte à décoloration, contenant 50 ml de solvant acétique. Sur le



fond de ces dernières repose un chevalet en U. L'installation complète est représentée dans la fig. 7.

A cet appareillage principal s'ajoutent les accessoires suivants :

Boîtier éclairage : On utilise un boîtier genre tireur de photographies, présentant un seul endroit ajouré de 20 x 70 mm ; il est destiné au travail à contre-jour.

Lampe à infra-rouge : C'est une lampe Philips 110 volts, 250 w, suspendue à 25 cm de la paillasse, sur un support auquel est fixée une arrivée d'air comprimé située à 5 cm de la paillasse.

Lames porte-objets : Ce sont des lames usuelles de microscopie, de bonne qualité, de dimensions de 26 x 76 mm ; elles seront soigneusement dégraissées à l'alcool-éther.

Papiers : De préférence, nous utilisons le papier Arche n° 302, de dimensions de 90 x 140 mm pour le séchage et l'emploi en chambre humide. Par contre, ce sera du papier n° 304 de dimensions 20 x 130 mm, plié selon le sens de la longueur au niveau du tiers de la largeur qui servira de pont conducteur entre la gélose et le tampon véronal.

#### REACTIFS

Tampon véronal : Sa formule est la suivante : véronal sodique 15,8 g, eau distillée neutralisée 770 g, acide chlorhydrique 0,1 N 230 g, mercuri-éthyl-thio-salicylate de sodium (Merseptyl) 0,1 g. Ce tampon a pour caractéristiques :



pH 8,2, force ionique 0,1.

Gélose tamponnée : constituée par gélose en poudre, d'excellente qualité ou purifiée, 1 g, eau distillée neutralisée 50 g, tampon véronal 50 g. Faire bouillir pendant 3 minutes environ en agitant. Couler dans des tubes à essai pyrex, 12 ml environ dans chacun. Boucher au caoutchouc. Cette gélose a un pH de 8,2. Elle a une concentration ionique moitié moindre que celle du tampon au véronal.

Gélose salée : Sa composition est la suivante : gélose en poudre, d'excellente qualité ou purifiée, 1 g, solution aqueuse de ClNa à 0,9 % 100 g, solution aqueuse de Merseptyl à 10 % II gouttes.

Gélose sans sel : gélose en poudre, d'excellente qualité ou purifiée, 2 g, eau distillée neutralisée 100 g, solution aqueuse de Merseptyl à 10 % II gouttes.

Eau Merthiolatée : Merseptyl 0,1 g, eau distillée 1 000 g.

Solvant acétique : Méthanol 900 ml, acide acétique 100 ml.

Solution d'Amidoschwartz : Amidoschwartz 1 g, solvant acétique 1 000 ml.

Fixateur : Acide acétique 1, alcool à 95° 70, eau 30.

### 3. Techniques.—

Avant de pratiquer l'immuno-électrophorèse, nous employons la technique de Micro-Cuchterlony pour déterminer le rapport optimum entre sérum et immunosérum de la zone d'équivalence (59, 70, 71). On sait en effet que la réaction de précipita-



tion est un phénomène de zones ; l'addition à une quantité fixe d'anticorps des quantités décroissantes d'antigènes donne lieu à la formation d'un précipité dont l'importance passe par un maximum, correspondant, le plus souvent, à une neutralisation complète de l'antigène ; la réaction immuno-électrophorétique a d'autant de valeur significative que nous nous plaçons dans cette zone d'équivalence.

a) Technique de Micro-Ouchterlony.

Les antigènes et les anticorps, étant contenus chacun dans des trous creusés dans le gel, diffusent l'un vers l'autre et forment un précipité linéaire à l'endroit où l'antigène et l'anticorps se trouvent en quantité convenable.

Lorsqu'on dispose plusieurs réservoirs à antigènes autour d'un réservoir à anticorps et qu'on y place divers antigènes autour de l'immunsérum correspondant, on peut observer plusieurs types de réaction. Si les deux antigènes voisins sont identiques entre eux : le trait de précipitation est continu. Si les deux antigènes voisins sont différents : les traits se croisent. Deux antigènes voisins partiellement identiques vont donner une ligne bifurquée.

La technique consiste à couler la gélose salée sur des lames porte-objets de 26 x 76 mm, dégraissées au préalable à l'alcool-éther. Après refroidissement, on découpe la gélose selon l'image du guide perforateur avec une aiguille de 30 mm de long et de diamètre extérieur 18/10 mm (fig. 5) : 1 trou



central, 6 trous périphériques. Chaque lame permet de faire deux expériences. Le trou central reçoit l'immunsérum et les trous périphériques l'antigène à plusieurs concentrations, d'ordinaire pur, dilué au  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/6$ ,  $1/8$ ,  $1/10$ . Les lames seront placées 6 heures dans la chambre humide. On lave, sèche, colore, comme pour l'immuno-électrophorèse (voir plus loin).

#### b) Technique d'Immuno-électrophorèse.

En examinant l'image fournie par la technique de Micro-Ouchterlony, nous avons fixé notre choix sur le rapport optimum antigène/anticorps qui a donné le maximum de précipitation, pour exécuter l'épreuve d'immuno-électrophorèse, dont voici les principes de manipulations :

i) Coulée de la gélose tamponnée : On liquéfie la gélose tamponnée et l'on coule 2 ml sur chaque lame porte-objet avec une pipette chaude. Le gel de gélose forme un ménisque sur les bords de la lame; son épaisseur est d'un mm environ. Il convient de travailler sur la plaque de verre placée horizontalement sur la feuille de plastique noir.

ii) Découpe des réservoirs : Après refroidissement (environ 5 minutes), découper la gélose avec le guide perforateur et son aiguille à évier branchée sur trompe à vide. Les trois trous sont destinés à recevoir des sérums, les deux fentes à recevoir des immunsérums.

iii) Dépôt de l'antigène : Le dépôt s'effectue jusqu'à effleurement de la surface du gel, grâce à une pipette Pasteur



étirée successivement deux fois pour supprimer tout écoulement par gravité. En plongeant celle-ci dans l'antigène de dilution choisie par la Micro-Ouchterlony, l'antigène y monte par capillarité. Par simples attouchements, l'antigène descend dans les réservoirs.

iv) Migration électrophorétique : Chaque bac d'électrophorèse peut être chargé de 5 lames à 3 trous, ce qui permet une étude de 15 sérums, ou d'un même sérum à plusieurs concentrations. Les cinq lames étant disposées côte à côte dans le bac d'électrophorèse, on met en place les ponts conducteurs mouillés au tampon véronal. Le bac d'électrophorèse est branché sur la sortie du redresseur, l'anode étant du côté des réservoirs d'antigène. La migration s'effectue sous couvercle (plaque de verre) pendant 40 minutes à 40 v, à la lisière des ponts conducteurs et gélose.

v) Précipitation immunologique : Après migration, charger d'immunsérums, à dilution choisie pour la technique de Micro-Ouchterlony, les fentes découpées sur la gélose en opérant comme en (iii). Mettre les lames en chambre humide. Neuf heures suffisent pour cette précipitation.

vi) Lavage : Nous trempions les lames durant 1 heure dans l'eau physiologique et 3 fois 5 minutes dans l'eau distillée. Pour ces opérations, le couvercle de la chambre humide servira avantageusement de récipient.

vii) Séchage : Les lames sont placées entre deux morceaux de

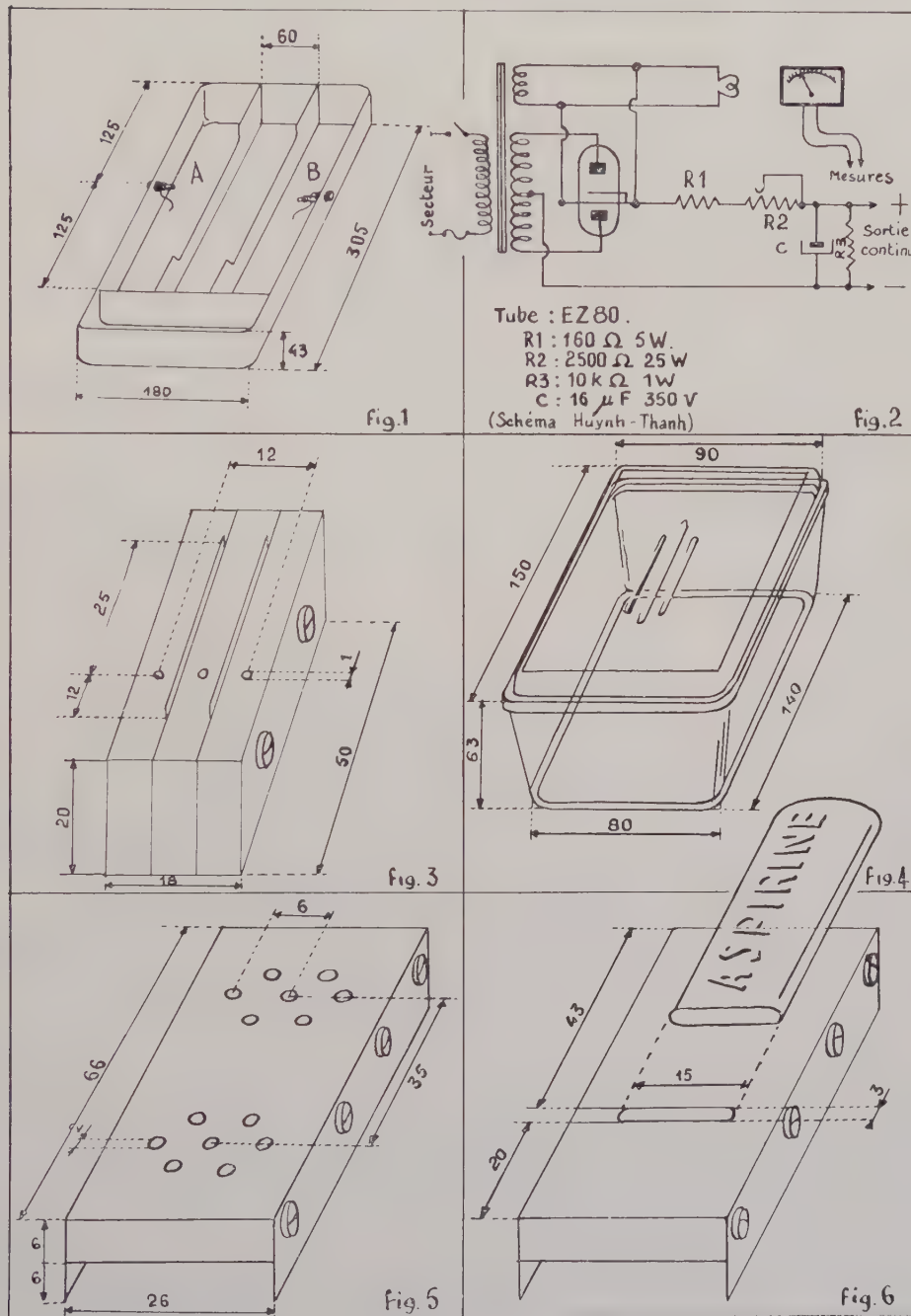


papier Arche 302, celui du dessus en contact avec la gélose étant légèrement imbibé d'eau distillée. Le tout repose sur la plaque de verre et à 25 cm de la lampe à infra-rouge, ventilé par une arrivée d'air. Le gel de gélose est réduit à l'état de film accolé par dessiccation. Il se désagrège et s'enlève aisément. Un léger frottement du pouce sur la lame enlève toute trace de papier. Un jet d'eau distillée achève le nettoyage du film de gélose (72).

viii) Colorations : Les lames sont alors trempées dans la solution d'Amidoschwartz (environ 5 minutes), lavées sous un faible jet d'eau distillée, puis placées dans le solvant acétique quelques minutes pour décolorer le fond de gélose. On lave finalement à l'eau distillée. Seules les lignes de précipitations restent colorées, en bleu. D'autres méthodes de coloration peuvent d'ailleurs être appliquées (73).



SCHEMAS DU MATERIEL POUR L'EXECUTION  
DE LA MICRO-OUCHTERLONY ET DE L'ULTRAMICRO-IMMUNOELECTROPHORESE





# INSTALLATION DE L'APPAREILLAGE DE LA TECHNIQUE DE LA MICRO-OUCHTERLONY ET DE L'ULTRAMICRO-IMMUNOELECTROPHORESE

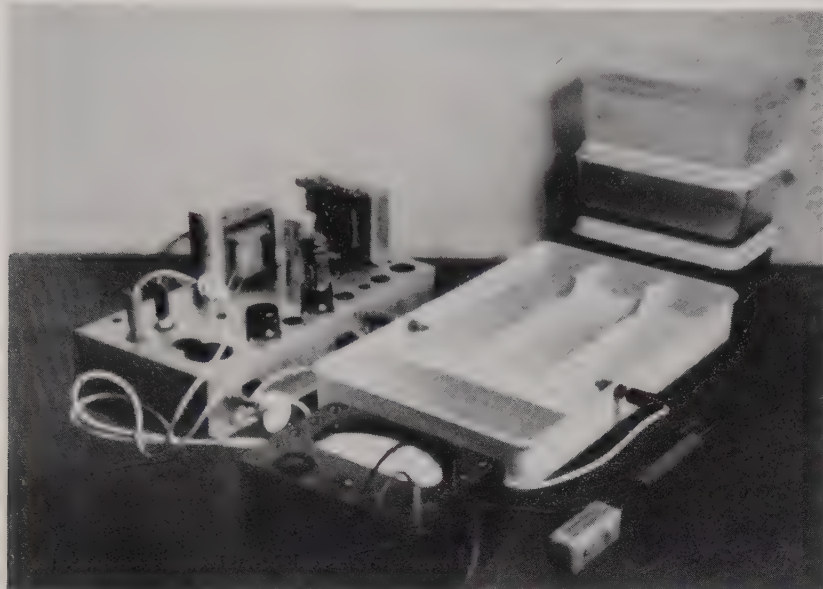
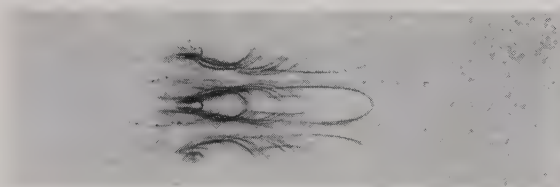


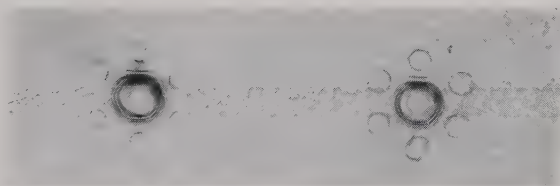
Fig. 7 Appareillage

Fig. 8



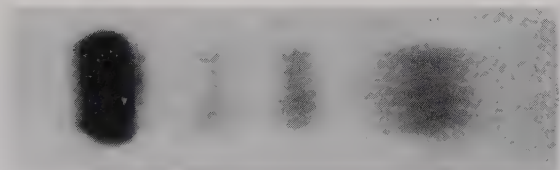
un test d'immuno-  
électrophorèse

Fig. 9



un test de micro-  
ouchterlony

Fig. 10



un test de micro-  
électrophorèse exécuté  
avec son guide perforé  
(Fig. 6), et le  
matériel commun à  
toute l'installation



## C. DOSAGE DES HEXOSAMINES LIEES

### AUX GLYCOPROTEINES

-:-:-

Nous avons été amené à déterminer les variations des sucres liés aux protéines. Les raisons en seront données ultérieurement. Pour l'instant, nous décrirons la technique d'investigation utilisée, basée sur les travaux de Menini (74). Le principe consiste à obtenir la coloration verte que donnent les glycoprotéines précipitées par l'éthanol absolu, avec une solution d'anthrone en milieu sulfurique à chaud. La spectrophotométrie pratiquée à 625 millimicrons est faite en comparaison avec une solution d'hexoses standard.

La solution d'hexoses standard est préparée comme suit : Mannose 50 mg + galactose 50 mg + acide benzoïque 250 mg + eau distillée qsp 1000 ml. La solution d'anthrone est à 0,2 p. 100 dans l'acide sulfurique 79 p. 100 (acide 2,5 + eau distillée 1) à préparer tous les jours, et à garder 2 heures dans la glace avant l'emploi.

La technique consiste à mettre en contact pendant 10 minutes et à centrifuger à 2 000 t/mn ce mélange : Ethanol refroidi 4 ml +



plasma en goutte à goutte dans l'éthanol 0,1 ml.

On rejette l'alcool, lave le précipité avec 4 ml d'éthanol, rejette l'alcool de lavage, égoutte le tube en le renversant et dissout le précipité avec 4 ml d'eau physiologique à 0,9 p. 100.

On place dans un bain de glace 3 tubes contenant chacun 5 ml de solution d'anthrone et fait la distribution suivante :

- . Au 1er tube "Dosage", ajouter 0,5 ml de solution de préci-  
/pité
- . au 2e tube "Etalon", ajouter 0,5 ml d'hexoses standard
- . au 3e tube "Témoin", ajouter 0,5 ml d'eau physiologique.

Après avoir mélangé, on bouche les 3 tubes au coton cardé, place au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, refroidit dans un bain de glace pendant 10 minutes.

On laisse en contact 30 minutes à la température ambiante ordinaire. Une couleur verte se développe et reste stable pendant une heure.

La spectrophotométrie doit être pratiquée dans cet intervalle de temps, à 540 ou de préférence à 625 millimicrons. Le calcul se fera d'après cette formule :

$$\frac{D.O. \text{ DOSAGE} - D.O. \text{ TEMOIN}}{D.O. \text{ ETALON} - D.O. \text{ TEMOIN}} \times 0,05 \times 40 \times 100$$

$$\text{soit : } \frac{D}{E} - \frac{T}{T} \times 200 = \text{mg Hexoses/100 ml de sérum.}$$

(D.O. = Densité optique)

La normale chez l'homme a été signalée par les auteurs comme étant à 100,2 - 138,6 mg/100 ml de sérum. La normale pour un plasma de boeuf dilué à 50 g pour 1000 en protéines est aux environs de 170 mg/100 ml, pour un plasma de veau dilué



à 50 g pour 1000 en protéines, elle est à 150 mg/100 ml. Les erreurs de dosage sont de l'ordre de  $\pm 5$  mg/100 ml.



## D. DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS

-:-:-

Ce dosage s'effectue selon un protocole adapté d'après la méthode de P. Ponty (75). Après défécation des plasmas par l'acide tungstique, les sucres réducteurs du filtrat réduisent partiellement à chaud une solution de ferricyanure en ferrocyanure ; celui-ci est dosé photométriquement par formation de bleu de prusse maintenu à l'état colloïdal par addition de polyvinylpyrrolidone.

La solution d'acide tungstique est préparée selon cette formule :

- i) Solution aqueuse de tungstate de sodium à 10 % ... 10 ml
- Eau distillée qsp ..... 500 ml
- Solution aqueuse d'acide sulfurique 0,66 N ..... 10 ml

Ce réactif ne se conserve pas plus de 15 jours.

ii) La solution aqueuse de ferricyanure de potassium pur R.P. à 2 g par litre doit être conservée à l'obscurité.

iii) Le réactif alcalin se prépare comme suit :



|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Carbonate de sodium anhydre ..... | 8 g    |
| Cyanure de potassium pur .....    | 1,5 g  |
| Eau distillée qsp ....            | 100 ml |

iv) La solution ferrique avec colloïde protecteur se conservant une quinzaine de jours, se prépare en mélangeant à parties égales solution A et solution B.

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Solution A : Sulfate ferrique ..... | 5 g    |
| Acide phosphorique à 85 p. 100 .    | 75 ml  |
| Eau qsp .....                       | 500 ml |

Solution B : Solution subtosan Spécia à 3,25 p. 100

La technique consiste à mélanger :

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| Solution d'acide tungstique .....                            | 9,9 ml |
| Plasma (refouler et aspirer pour rincer la<br>pipette) ..... | 0,1 ml |

On filtre et distribue comme suit dans 2 tubes de Folin :

|                                               |      |
|-----------------------------------------------|------|
| Tube Dosage = le filtrat tungstique .....     | 2 ml |
| Tube Témoin = la solution d'acide tungstique. | 2 ml |

On ajoute dans les 2 tubes :

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Solution de ferricyanure ..... | 1 ml |
| Réactif alcalin .....          | 1 ml |

Les tubes étant bouchés au coton cardé, on les met au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, on refroidit sous un courant d'eau et ajoute ensuite :

|                                                      |      |
|------------------------------------------------------|------|
| Solution ferrique avec colloïde,<br>protecteur ..... | 3 ml |
|------------------------------------------------------|------|



On mélange par retournements, attend 5 minutes et complète à 25 ml avec de l'eau distillée, puis on mélange à nouveau.

La lecture se fera au photomètre, avec un écran rouge foncé, 660 à 700 millimicrons. La différence des densités optiques, reportée sur la courbe, indique la concentration du glucose en mg par litre dans la solution à doser (déféquat au 100e) soit y.

Le taux de sucres réducteurs en grammes par litre est =  $y \cdot 100/1000$ , soit  $y/10$ .

L'étalonnage a été réalisé à partir d'une solution de glucose à 10 p. 100 qu'on diluera au 4e avec de l'eau distillée. On en mettra dans une série 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 ml, ce qui correspond respectivement à 5, 10, 15, 20, 25 mg de glucose par litre. On complète à 2 ml avec la solution d'acide tungstique et effectue la réaction comme susmentionné (voir fig. 11).

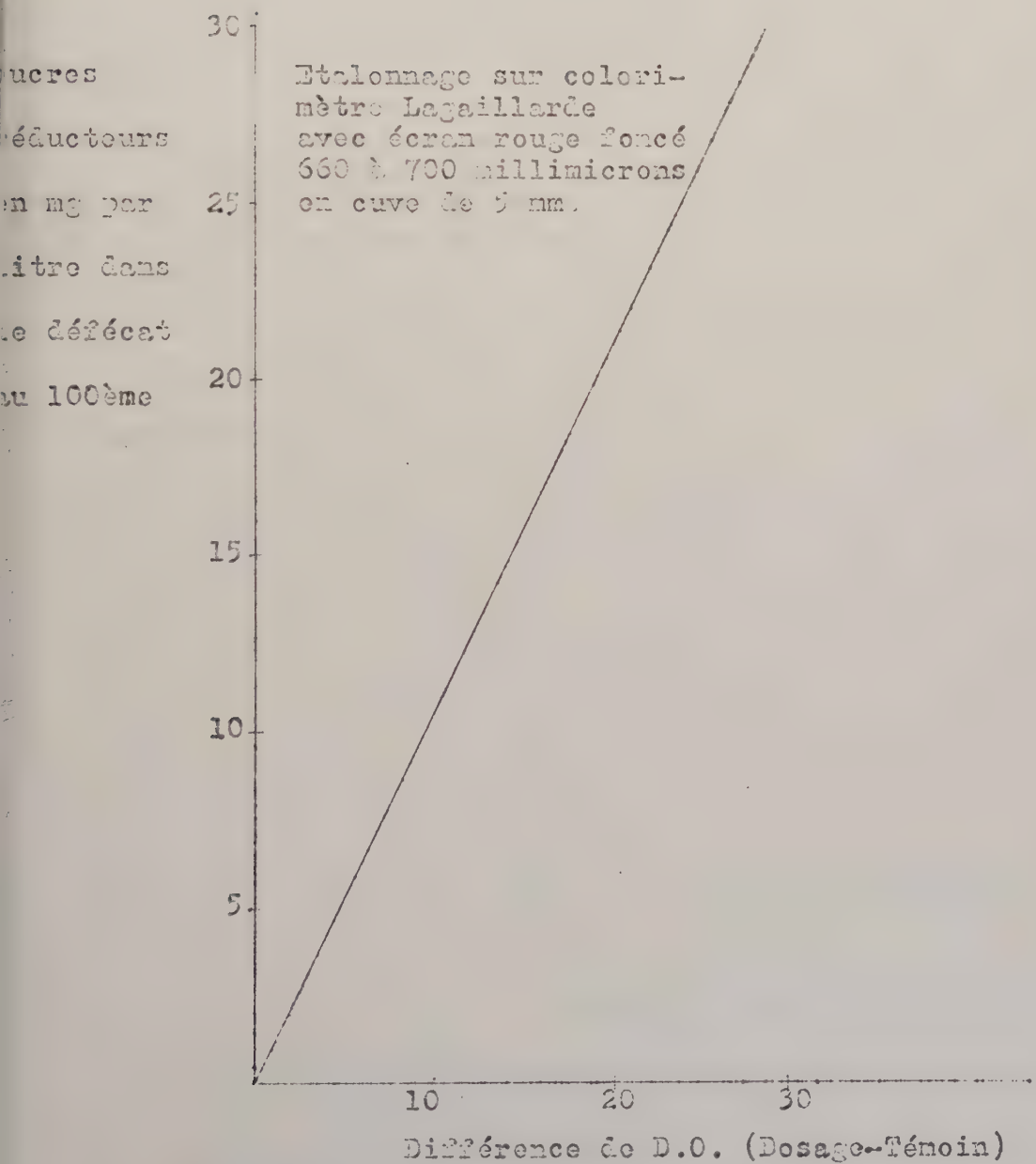
La normale chez l'homme est comprise entre 0,90 et 1,10 g/1000 ml de sang total. La normale pour un plasma de boeuf dilué à 50 g pour mille en protéines est aux environs de 0,85 g p. 1000 ; pour un plasma de veau dilué à 50 g pour mille en protéines, elle est à 0,90 g p. 1000.

Les erreurs de dosages sont de l'ordre de  $\pm 2$  mg/100 ml.



Fig. 11

Courbe du microdosage des sucres réducteurs





## E. REACTION DE DEVIATION DU COMPLEMENT

(Type Kolmer)

-:-:-

L'étude sérologique est basée sur une réaction d'hémolyse selon la technique de Kolmer, adaptée aux besoins présents. Cette réaction permet une expression quantitative conventionnelle des résultats.

### Les éléments de la réaction.-

1. Les sérums proviennent des immunsérums de lapins (voir chapitre "les anticorps") employés, dilués selon le cas.
2. L'eau physiologique est une solution de chlorure de sodium pur pour analyses à 0,85 p. 100 dans l'eau distillée.
3. Les antigènes proviennent des 12 plasmas de départ dilués au 1/4.
4. Le complément au cobaye est le complément lyophilisé de l'Institut Pasteur, dilué à 1/100.
5. Les globules rouges de mouton, dilués à 2/100.
6. Le sérum hémolytique antimouton, originaire de l'Institut Pasteur est dilué à 2 unités par 0,1 ml.

La technique simplifiée à des doses réduites à 1/5 est caracté-



risée par l'utilisation des 2 unités de complément et de 2 unités d'hémolysine. Les sérums à examiner sont chauffés au préalable pendant 30 minutes dans un bain-marie à 56° C. La technique comporte un titrage préalable du complément, schématisé comme suit :

TABLEAU II  
TITRAGE DU COMPLEMENT

|                                                                                |                               |                 |                 |                |                |                |                |                |                |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Complément à 1/100                                                             | 0,10                          | 0,15            | 0,20            | 0,25           | 0,30           | 0,35           | 0,40           | 0,45           | 0,50           |
| Eau physiologique                                                              | 0,40                          | 0,35            | 0,30            | 0,25           | 0,20           | 0,15           | 0,10           | 0,05           | 0,01           |
| Antigène dilué au 1/4                                                          | 0,1                           | 0,1             | 0,1             | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            |
|                                                                                | 1 heure au bain-marie à 37° C |                 |                 |                |                |                |                |                |                |
| Sérum hémolytique 2 unités                                                     | 0,1                           | 0,1             | 0,1             | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            |
| Globules rouges à 2 p.100                                                      | 0,1                           | 0,1             | 0,1             | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            | 0,1            |
|                                                                                | 1 heure au bain-marie à 37° C |                 |                 |                |                |                |                |                |                |
| Dilution du complément à utiliser pour avoir 2 unités dans 0,4 cm <sup>3</sup> | $\frac{1}{200}$               | $\frac{1}{133}$ | $\frac{1}{100}$ | $\frac{1}{80}$ | $\frac{1}{66}$ | $\frac{1}{57}$ | $\frac{1}{50}$ | $\frac{1}{44}$ | $\frac{1}{40}$ |

La dose minimale de complément est indiquée par le tube contenant la plus faible quantité de sérum de cobaye présentant une hémolyse totale.

Pour la réaction, on utilise 2 doses minima (2 unités). Dans la dernière ligne du tableau sont indiquées, en regard de chacune des quantités de complément, les dilutions auxquelles il faut amener le sérum de cobaye de façon à avoir 2 unités de complément dans 0,4 cm<sup>3</sup>.

La réaction d'hémolyse est effectuée selon le schéma suivant :



TABLERAU III

|                                                                                                                                            | Réaction | Témoin<br>sérum | Témoin<br>Antigène |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------|--------------------|
| Sérum à examiner à dilution variable(*)                                                                                                    | 0,05     | 0,05            | 0                  |
| Antigène dilué au 1/4                                                                                                                      | 0,1      | 0               | 0,1                |
| Sérum physiologique                                                                                                                        | 0        | 0,1             | 0,5                |
| Complément dilué 2 unités                                                                                                                  | 0,4      | 0,4             | 0,4                |
| Fixation du complément pendant 12 à 16 heures dans une glacière<br>à une température de +6 à +8° C, puis 10 minutes au bain-marie à 37° C. |          |                 |                    |
| Sérum hémolytique                                                                                                                          | 0,1      | 0,1             | 0,1                |
| Globules rouges à 2 p. 100                                                                                                                 | 0,1      | 0,1             | 0,1                |

Mettre au bain-marie à 37° C.

Lire les résultats 10 minutes après la lyse complète des témoins.

(\*) Comme nous cherchons à apprécier quantitativement la richesse en anticorps des immunsérums, il convient de les employer purs, dilués au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. Nous mettons donc en expérience 6 tubes de réaction pour chaque titrage et nous retenons le tube non hémolysé de la plus grande dilution.

Exemple : Si le tube de la plus grande dilution non hémolysé est 1/16, la réponse indique que le sérum titre 16 unités.



3ème Partie

R E S U L T A T S    E X P E R I M E N T A U X

---



## A. ETUDE SEROLOGIQUE DES PLASMAS DESPECIFIES

-:-:-

Cette étude a pour but d'évaluer :

- d'une part la destruction de l'antigénicité native au fur et à mesure de l'élévation de température, facteur capital de la préparation,

- d'autre part la formation d'une antigénicité nouvelle au cours de cette préparation.

a) L'antigénicité native peut se révéler à partir de l'immunsérum de lapin anti-plasma natif. On a donc employé comme antigène des plasmas despécifiés, au nombre de 5 pour le plasma de boeuf, et de 5 pour le plasma de veau, au total 10 antigènes. L'anticorps était le sérum anti-plasma natif correspondant à chaque cas.

Nous notons les titres d'antigénicités natives en fonction des températures de désanaphylactisation, en employant la technique de titrage de Kolmer comme précédemment mentionné, c'est-à-dire sur chaque immunsérum employé pur et dilué au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau IV.



TABLEAU IV

ANTIGENICITE NATIVE DES PLASMAS DESPECIFIES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

| Température de<br>despécification | Taux d'anticorps<br>de boeuf | Taux d'anticorps<br>de veau |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 57° C                             | 80                           | 40                          |
| 67° C                             | 40                           | 20                          |
| 77° C                             | 20                           | 10                          |
| 87° C                             | 20                           | 5                           |
| 110° C                            | 10                           | 0                           |

b) L'antigénicité nouvelle est évaluée de la même manière.

Pour ce faire, nous employons comme antigènes : les plasmas despécifiés, comme anticorps : les immunosérums de lapin anti-plasma despécifié correspondant. Et nous notons de même les titres des antigénicités nouvelles en fonction des températures de désanaphylactisation :

TABLEAU V

ANTIGENICITES NOUVELLES DES PLASMAS DESPECIFIES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

| Température de<br>despécification | Taux d'anticorps<br>de boeuf | Taux d'anticorps<br>de veau |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 57° C                             | 8                            | 4                           |
| 67° C                             | 16                           | 8                           |
| 77° C                             | 32                           | 4                           |
| 87° C                             | 4                            | 1                           |
| 110° C                            | 2                            | traces                      |

Les résultats sont réunis dans les figures 12 et 13.



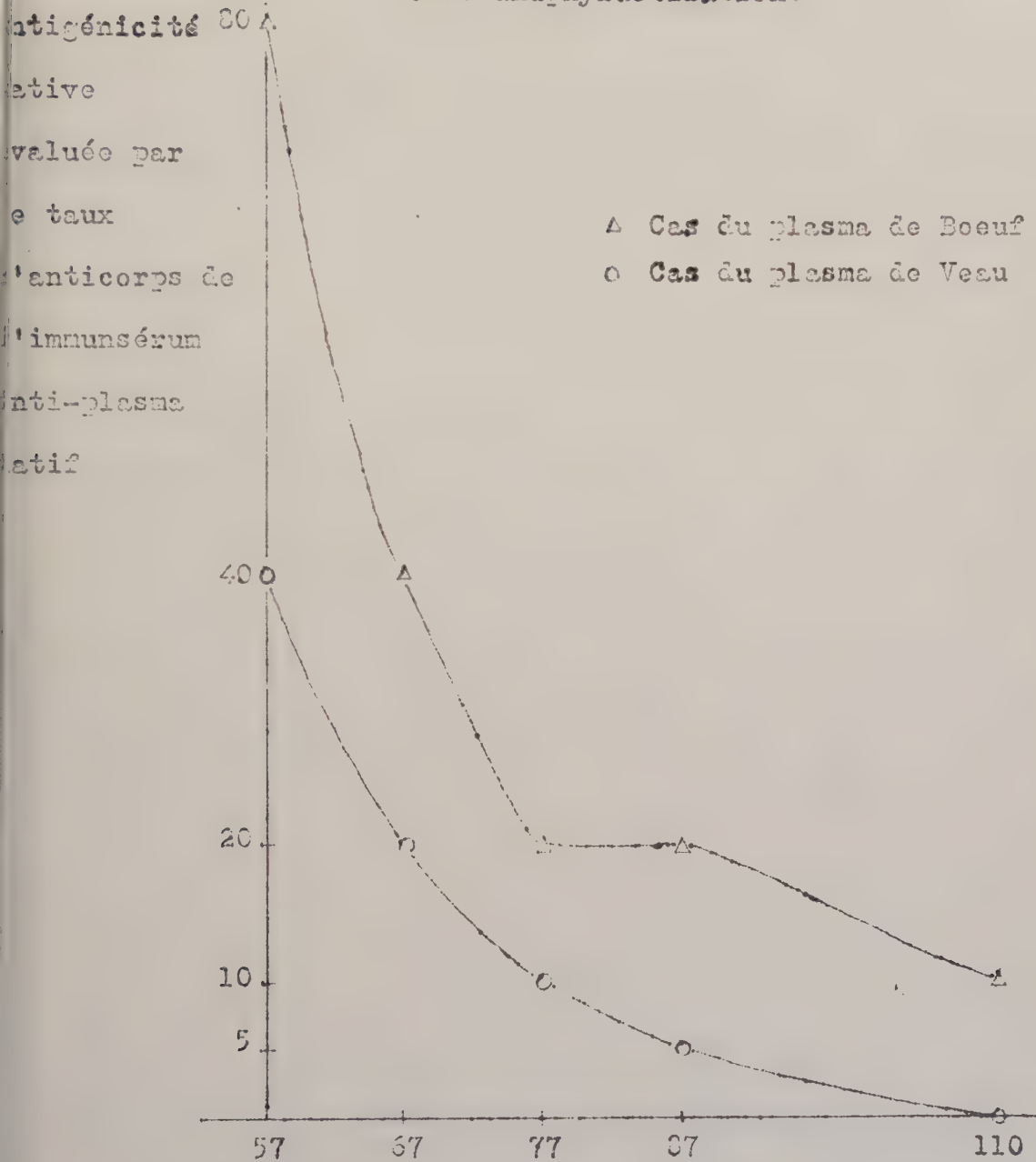
Soulignons d'ores et déjà quatre points essentiels :

- la non disparition intégrale de l'antigénicité native, lorsque le plasma traité provient d'un animal adulte,
- la disparition intégrale de l'antigénicité native, lorsque le plasma traité provient d'un animal jeune,
- l'apparition d'une antigénicité nouvelle maximale, pour 67° C et 77° C, selon l'origine du plasma, la température la plus basse correspondant au plasma d'animal jeune,
- la disparition totale de cette antigénicité à 110° C pour le plasma de veau.



Fig. 12

Courbe d'antigénicité native  
en fonction de la température  
de désanaphylactisation.

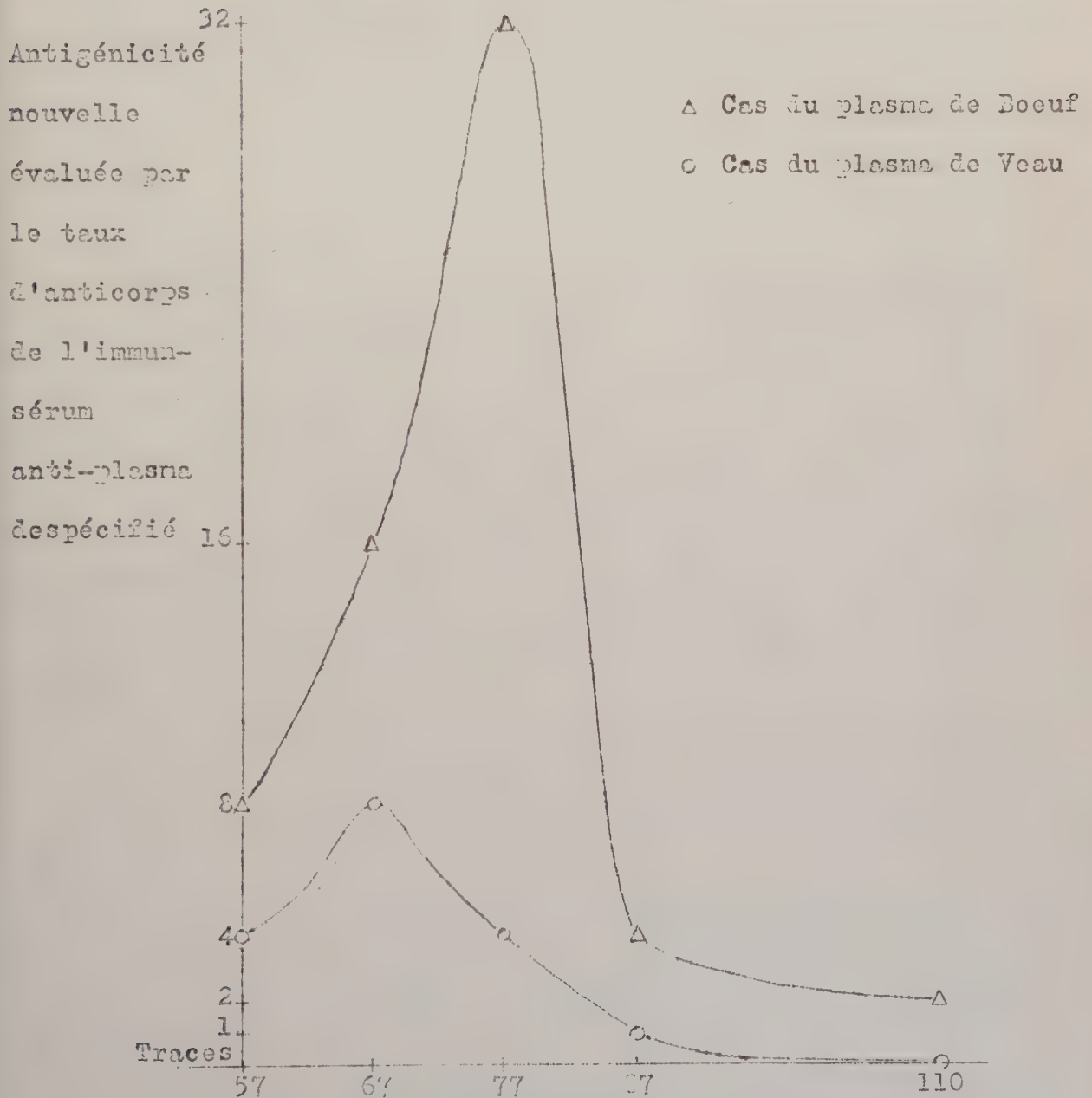


Température de désanaphylactisation en degrés  
centigrades.



Fig. 13

Courbe d'antigénicité nouvelle  
en fonction de la température  
de désanaphylactisation.



Température de désanaphylactisation en degrés centigrades.



## B. RESULTATS OBTENUS AVEC LA TECHNIQUE DE MICROC-OUCHTERLONY

-:-:-

### 1. Cas du plasma de boeuf.

L'étude de l'antigénicité native du plasma de boeuf est faite sur le côté gauche de 6 lames marquées Bn, B57, B67, B77, B87, B110 (fig. 14). A la périphérie de chaque image sont déposés les antigènes à l'état pur, et dilués au 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/10. La lame Bn reçoit l'antigène de boeuf natif, déposé en position nord. Le même antigène, dilué du 1/2 au 1/10, occupe les trous périphériques dans le sens des aiguilles d'une montre.

Les lames B57, B67, B77, B87, B110 reçoivent de même l'antigène plasma de boeuf despécifié respectivement à 57, 67, 77, 87, 110° C.

Le centre de chaque image de ces 6 lames (côté gauche seulement) reçoit l'immunsérum de lapin anti-boeuf natif (anti Bn) à l'état pur.

L'ensemble de ces images montre que l'antigénicité native diminue au fur et à mesure que la despécification progresse en fonction de la température.



En effet, l'antigénicité native de Bn, traduite par cinq lignes de précipitation, n'en comporte déjà que 2 ou 3 vers 57° C, diminue progressivement et devient pratiquement invisible avec les plus hautes températures

L'étude de l'antigénicité nouvelle du plasma de boeuf est faite sur le côté droit de ces mêmes 6 lames. A la périphérie, on dispose l'antigène, pur ou dilué du 1/2 au 1/10, en commençant par la position nord et en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre, comme précédemment.

Le centre de la lame Bn reçoit de l'immunsérum de lapin antiboeuf natif à l'état pur. Le centre des lames B57, B67, B77, B87, B110 reçoit de l'immunsérum antiplasma despécifié respectivement à 57, 67, 77, 87, 110° C.

L'ensemble des images du côté droit montre l'existence de l'antigénicité nouvelle qui accuse un maximum à 77° C de despécification. Ceci amènera une confrontation très intéressante des résultats émanant de l'étude biologique et de l'étude sérologique. En effet, à 57° C on voit apparaître déjà 2 fractions antigéniques nouvelles dont les lignes de précipitation deviennent plus marquantes à 67° C. Elles atteignent un maximum à 77° où l'on note un maximum de trois fractions nouvelles, mais elles tendent à disparaître avec des températures plus hautes

## 2. Cas du plasma de veau.

L'étude de l'antigénicité native du plasma de veau est faite, de même, sur le côté gauche des 6 lames marquées Vn, V57,



Fig. 14

LAMES DE MICRO-OUCHTERLONY  
(cas du plasma de boeuf)

Le côté gauche  
vérifie  
l'antigénicité  
native

Le côté droit  
vérifie  
l'antigénicité  
nouvelle

Bn



B57



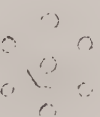
B67



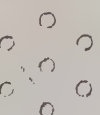
B77



B87



B110





V67, V77, V87, V110 (fig. 15).

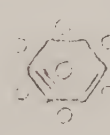
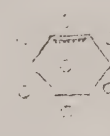
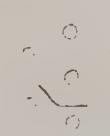
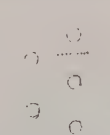
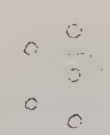
On place les antigènes et les anticorps de façon analogue à la disposition adoptée pour le plasma de boeuf, mais en employant les produits provenant du veau.

L'ensemble des images montre que l'antigénicité native diminue au fur et à mesure que la désépécification avance. Elle est bien moins forte que dans le cas du plasma de boeuf et à 110° C de désanaphylactisation, elle disparaît. En effet, on distingue à peine 3 ou 4 fractions antigéniques natives à Vn. V57 n'en présente plus que 2. Toutes ces fractions ne sont plus visibles pour les plus hautes températures.



Fig. 15

LAMES DE MICRO-OUCHTERLONY  
(cas du plasma de veau)

|      | Le côté gauche<br>vérifie<br>l'antigénicité<br>native                               | Le côté droit<br>vérifie<br>l'antigénicité<br>nouvelle                              |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Vn   |    |    |
| V57  |   |   |
| V67  |  |  |
| V77  |  |  |
| V87  |  |  |
| V110 |  |  |



L'étude de l'antigénicité nouvelle du plasma de veau est faite sur le côté droit de ces mêmes lames.

L'ensemble des images montre un détail très intéressant. Faible en général, non révélée à la température de désanaphylactisation de 110° C, elle accuse un maximum à 67° C et non à 77° C. Ce détail sera l'objet d'une confrontation ultérieure.

Cette antigénicité nouvelle est bien moins forte que celle déjà vue dans le cas du plasma de boeuf. Elle présente, en effet, seulement 2 fractions nouvelles à peine révélables à 77° C; le plasma de boeuf en présente un minimum de 3, rappelons-le, à 77° C.

Tous ces résultats apparaissent dans les fig. 13 et 14. Ils sont en parfaite corrélation avec les résultats de l'étude de déviation du complément, c'est-à-dire :

- pour le plasma de veau, on constate une disparition progressive et intégrale de l'antigénicité native et l'apparition puis la disparition complète de l'antigénicité nouvelle.
- pour le plasma de boeuf : une disparition progressive avec un reliquat significatif de l'antigénicité native ; l'apparition d'une nouvelle antigénicité, le passage au maximum pour le plasma chauffé à 77° C, puis une disparition progressive de l'antigénicité nouvelle avec une minime persistance



## C. RESULTATS D'IMMUNO-ELECTROPHORESE

-:-:-

## 1. Cas du plasma de boeuf.

L'expérimentation a été faite sur 6 lames marquées Bn, B57, B67, B77, B87, B110 (fig. 16). La partie supérieure de chaque lame est destinée à vérifier l'antigénicité native, la partie inférieure vérifie l'antigénicité nouvelle, le sens du courant électrique étant de gauche à droite. Grâce à la séparation électrophorétique, nous serons plus renseignés sur le nombre de fractions antigéniques qu'avec la Micro-Ouchterlony, et il sera intéressant de noter leurs mobilités de migration.

Aussi, au départ, l'antigénicité native présente cinq fractions qu'on reconnaît aisément sur la partie supérieure de la lame Bn : Albumine, Alpha 1, Alpha 2, Bêta, Gammes-globulines. Ces fractions changent d'aspect à 67° C, bien qu'elles ne migrent encore à droite du point de départ de la lame B67 (\*).

---

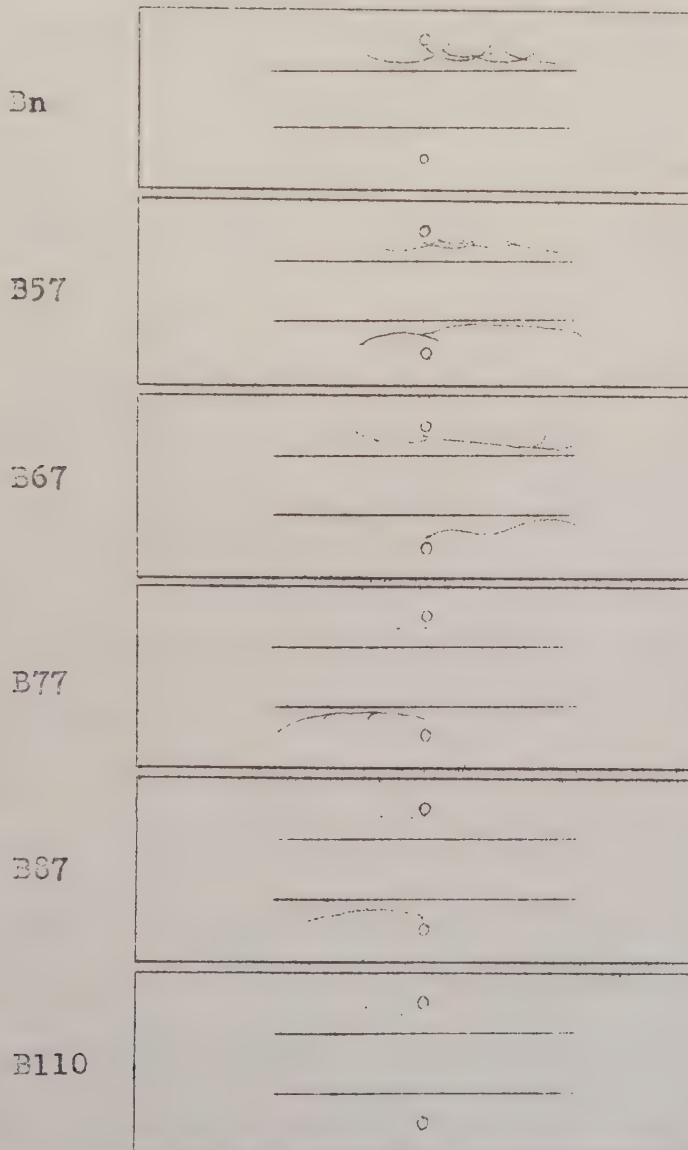
Il est toutefois utile de rappeler ici que, théoriquement, ces déplacements se font plutôt vers le côté gauche du point de départ, c'est-à-dire en sens inverse du courant électrique, rappelons-le de droite à gauche. C'est le phénomène d'électro-endosmose qui ramène ces fractions en arrière, c'est-à-dire vers la droite du point de départ, sinon elles auraient migré encore beaucoup plus loin vers la gauche de celui-ci. On vérifie et évalue cette force d'électro-endosmose en mettant au point de départ une goutte de solution de lévane; cette substance polysaccharidique lévogyre ne migrera pas sous l'effet du courant électrique et se laissera transporter par le phénomène d'électro-endosmose.



Fig. 16

LAMES D'ULTRAMICRO-IMMUNOELECTROPHORESE  
(cas du plasma de boeuf)

La partie supérieure de chaque lame vérifie l'antigénicité native.  
La partie inférieure de chaque lame vérifie l'antigénicité nouvelle.





Le schéma de cette lame montre qu'à cette température il y a deux familles de protéines (fig. 17, partie supérieure).

La famille I, provenant des albumines et la famille G, provenant des globulines.

- . Les familles I et G ne possédant aucun motif commun, comportent au moins deux motifs différents car les traits de précipitation I et G se croisent.
- . La famille G présente 3 bifurcations II, III, IV qui correspondent à 3 fractions antigéniques partiellement différentes. Ces 3 fractions possèdent donc un motif commun et au moins trois fois deux motifs différents.

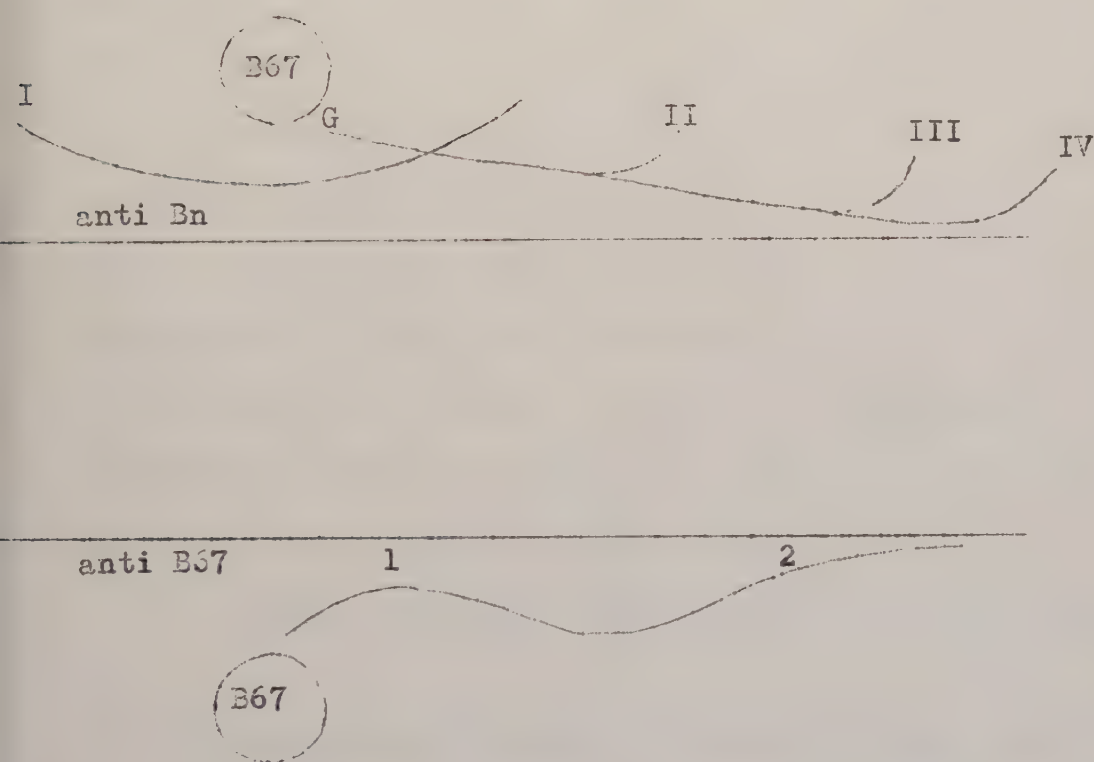
En mai 1957, lors des IV<sup>e</sup> journées biochimiques franco-helvético-italiennes, Enselman et Tigaud (76) ont communiqué des résultats obtenus par l'électrophorèse libre, que recourent parfaitement les informations que nous recevons de l'immuno-électrophorèse. Selon ces auteurs, "la formation d'un sérum normal à 65° C provoque l'apparition de quatre pics, un pic prédominant (I), un autre plus important (III), quelquefois un pic entre les deux (II) et un pic accessoire de protéines non entièrement transformées représentant environ 10 % des protéines totales (IV). Ce pic disparaît lorsqu'on augmente la température et il semble à peu près certain qu'il s'agit de protéines insuffisamment modifiées pour rejoindre les pics principaux ...". Ainsi, il semble certain que le pic I représente le produit de transformation de l'albumine, les pics



Fig. 17

SCHEMA DE LA LAME D'IMMUNO-ELECTROPHORESE B67

La partie supérieure vérifie l'antigénicité native  
la partie inférieure vérifie l'antigénicité nouvelle





II et III le produit de transformation des globulines et le petit pic IV un produit de transformation inachevée des globulines dont l'importance est liée aux conditions thermiques".

Nous pouvons ajouter, en plus de ces résultats insignes, les diverses constatations reflétées de la lame B67 (fig. 17, partie inférieure). A cette température, il se forme déjà deux fractions nouvelles (1) et (2). Comme celles-ci présentent un point d'inflexion, elles doivent se former un motif commun qui est révélé par le même immunosérum et au moins deux motifs différents qui ne sont pas révélés. Cette apparition d'antigénicité nouvelle atteindra son point culminant à 77° C où l'on observera trois fractions antigéniques (a), (b), (c) qui sont totalement différentes de (1) et (2) et qui migrent à gauche du point de départ (fig. 18). Ce qui prouve qu'il y a, à cette température, un remaniement intramoléculaire très important en ce qui concerne le plasma de boeuf. Ce remaniement a pour conséquences : accroissement de la vitesse de migration, production de nouveaux motifs antigéniques.

En résumé, les images immuno-électrophorétiques montrent que :

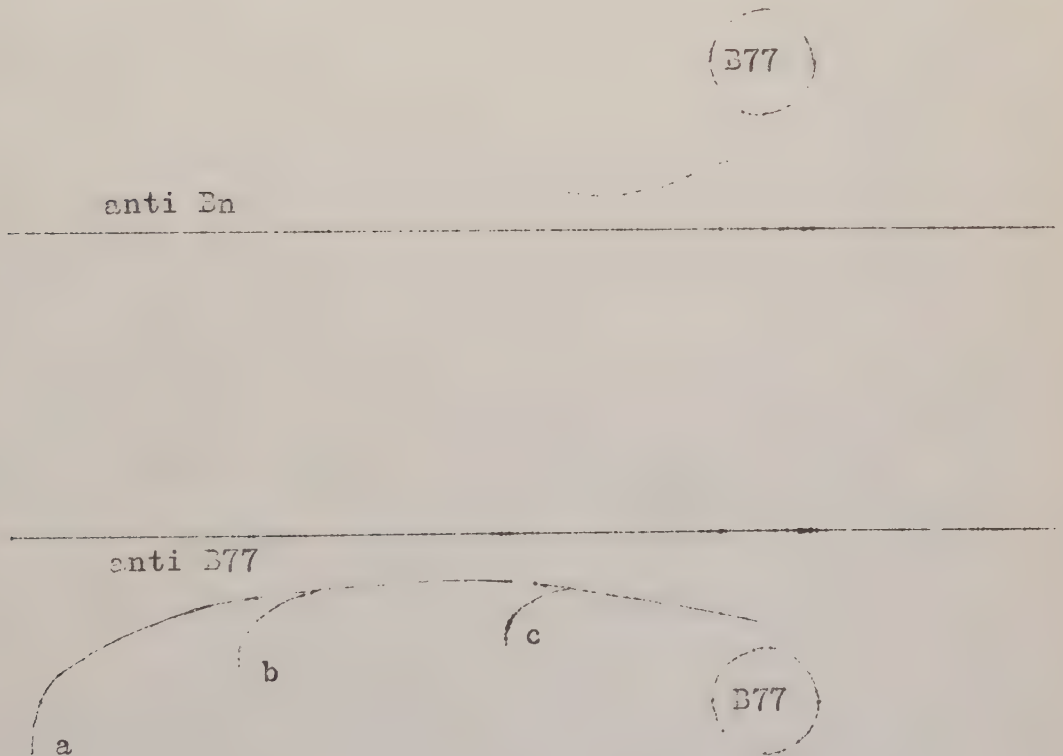
- l'antigénicité native du plasma de boeuf formée d'au moins cinq fractions au départ, décroît au fur et à mesure que la température de désanaphylactisation progresse. A 67° C, elle comporte en tout quatre fractions. La fraction I semble provenir des albumines, les fractions II, III, IV des globu-



Fig. 18

SCHEMA DE LA LAME D'IMMUNO-ELECTROPHORESE B77

La partie supérieure vérifie l'antigénicité native  
La partie inférieure vérifie l'antigénicité nouvelle





lines déjà bien remaniées par la formaldéhyde et la chaleur. Toutes ces fractions, surtout II, III, IV, présentent de nouveaux sites antigéniques, mais conservent du moins leur principale ossature moléculaire ; elles migrent toujours à droite du point de départ. C'est à partir de 77° C que ces fractions natives disparaissent progressivement,

- l'antigénicité nouvelle du plasma de boeuf fait déjà son apparition à 57° C pour se préciser à 67° C où elle semble résulter de la présence de 2 fractions (1) et (2) possédant un motif commun avec un minimum de trois fois deux motifs différents. Cette antigénicité nouvelle décroît à 87° C, puis à 110° C, mais reste toujours visibles sur la lame d'immuno-électrophorèse B110 où toute trace d'antigénicité native est difficilement décelable.

En somme, la despécification du plasma de boeuf arriverait à supprimer la presque totalité de l'antigénicité native. Elle ne pourrait pas faire disparaître complètement l'antigénicité nouvelle formée au cours de la despécification.

## 2. Cas du plasma de veau.

L'expérimentation a été faite sur 6 lames marquées Vn, V57, V67, V77, V87, V110 (fig. 19). La partie supérieure de chaque lame vérifie l'antigénicité native. La partie supérieure vérifie l'antigénicité nouvelle.

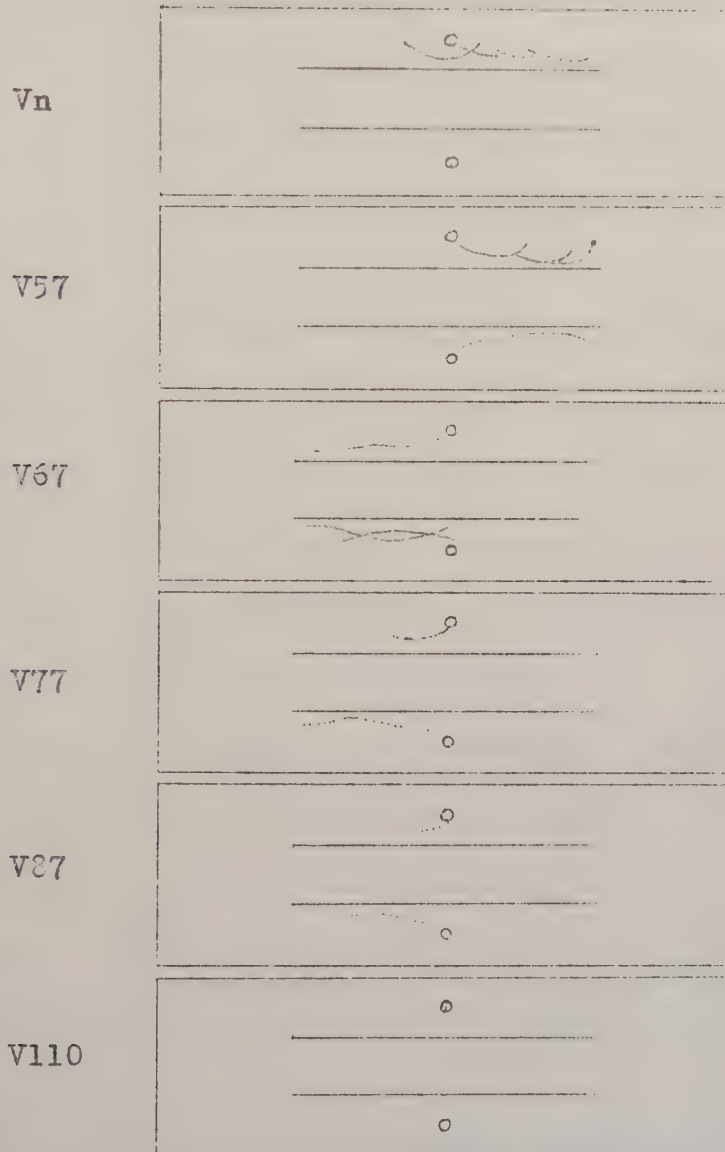
Au départ, l'antigénicité native s'avère déjà beaucoup moins faible par rapport au cas du plasma de boeuf. On dénombre sur la lame d'immuno-électrophorèse Vn à peine 3 ou 4 fractions.



Fig. 19

LAMES D'ULTRAMICO-IMMUNOELECTROPHORESE  
(cas du plasma de veau)

La partie supérieure de chaque lame vérifie l'antigénicité native.  
La partie inférieure de chaque lame vérifie l'antigénicité nouvelle.





Dans la lane V57 (fig. 20, partie inférieure), on perd la trace de l'albumine, il n'y reste que les 3 fractions globuliniques se confondant déjà pour avoir en commun un motif antigénique, car elles présentent, avec le même immunsérum, une ligne de précipitation commune à trois bifurcations, ce qui implique en plus un minimum de trois fois deux motifs différents. Ces fractions subissent déjà un profond réarrangement intramoléculaire à 57° C. La partie supérieure de la fig. 21 montre, en effet, une migration à gauche du point de départ, c'est-à-dire une augmentation de vitesse, ce qui justifierait une scission intramoléculaire donnant des molécules plus petites et détruisant déjà la plus grande partie de l'antigénicité native. D'ailleurs, celle-ci ne tarde pas à disparaître : à 77° C, on l'aperçoit à peine et à partir de 87° C, et surtout à 110° C, elle a complètement disparu.

Quant à l'antigénicité nouvelle, elle prend naissance à 57° C par l'apparition d'un seul motif à vitesse de migration globulinique, elle devient maximale à 67° C avec l'apparition de deux fractions nouvelles à vitesse de migration plus rapide, se plaçant à gauche du point de départ (fig. 20 et 21, parties inférieures).

Cette antigénicité nouvelle tend à disparaître vers 77° C où l'on voit les motifs se fusionner en un seul pour disparaître progressivement à 87° C ; elle est enfin inexistante à 110° C.

En somme, l'antigénicité native du plasma de veau est due



Fig. 20

SCHEMA DE LA LAME D'IMMUNO-ELECTROPHORESE V57

La partie supérieure vérifie l'antigénicité native.  
La partie inférieure vérifie l'antigénicité nouvelle.

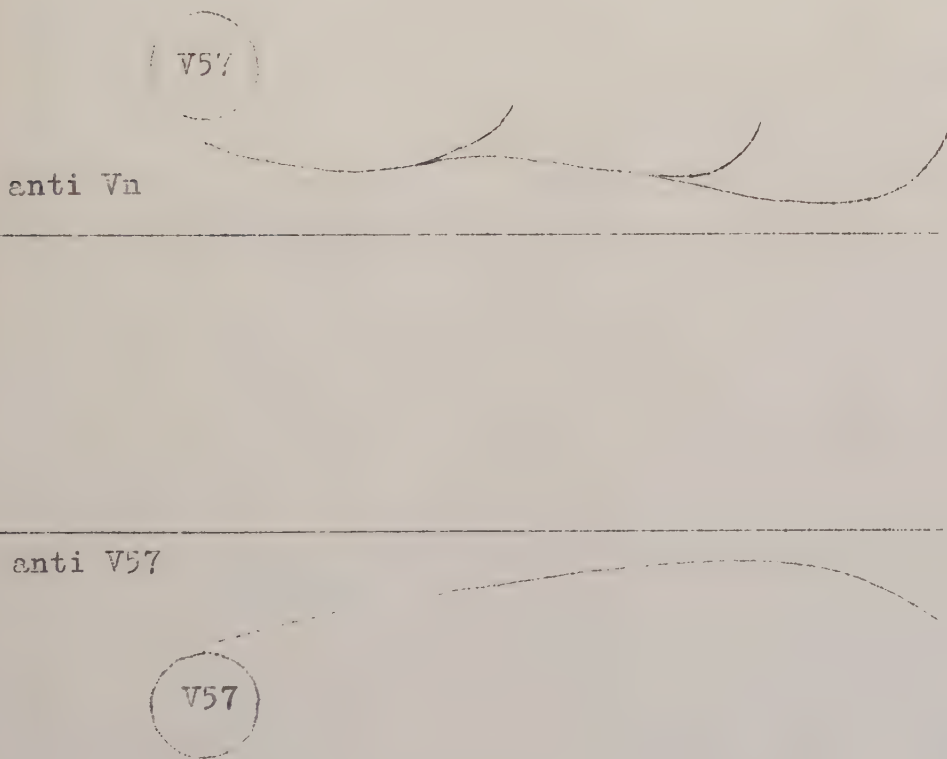




Fig. 21

SCHEMA DE LA LANE D'IMMUNO-ELECTROPHORESE V67

La partie supérieure vérifie l'antigénicité native

La partie inférieure vérifie l'antigénicité nouvelle





à 3 à 4 fractions à peine décollables selon les protocoles de notre immunisation - nous sommes en effet limités par le fait de ménager les bêtes en utilisant des doses identiques mais simultanément non toxiques pour les deux séries de lapins recevant du plasma de boeuf d'une part et de veau d'autre part (voir "Préparation des immunsérums") - cette antigénicité décroît rapidement avec la hausse de la température de désanaphylactisation, pour disparaître complètement à 110° C.

L'antigénicité nouvelle du plasma de veau, apparaissant maximale à 67° C, disparaît en totalité à 110° C. On voit donc sans peine qu'il y a un décalage d'apparition et de disparition de l'antigénicité nouvelle pour les cas des plasmas de boeuf et de veau. Le net avantage est du côté du plasma de veau où les protéines semblent être beaucoup plus aisées à déspecifier.



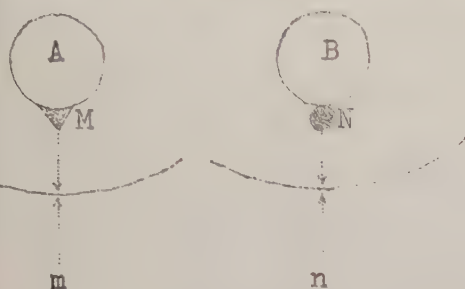
Notes. - Exemples de lecture des lames d'immunoélectrophorèse.

Pour l'interprétation des lames d'immunoélectrophorèse, on se basera sur les 4 schémas de précipitation types suivants : (A) et (B) étant les antigènes séparés après migration électrophorétique; m, n, o, p étant les anticorps correspondants aux motifs antigéniques M, I, O, P que peuvent porter les antigènes (A) et (B). L'exemple de lecture de la lame "précipitation du type III" fera comprendre les lames des autres types. Par convention, nous désignons :

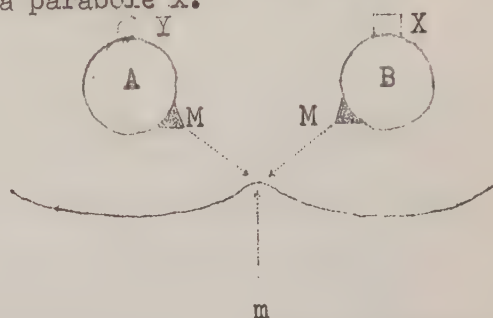
(B)MX = antigène (B)

porteur du motif antigénique révélé M (représentation en Noir)  
et porteur du motif non révélé X (représentation en Blanc)

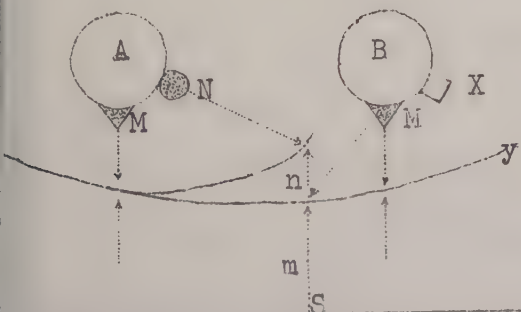
Lame du type III : en S, de la diffusion ( $m+n$ ), seulement m est arrêté par (B)M. venant de B, l'anticorps n non fixé traverse la frontière y pour se fixer plus loin dans le prolongement de la parabole x.



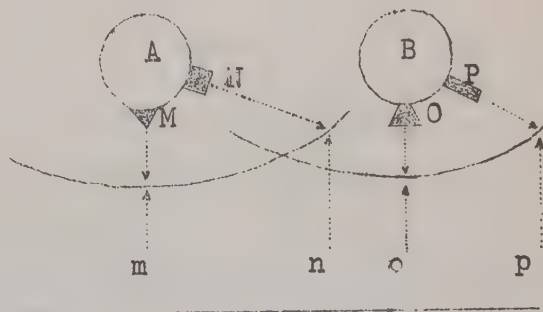
TYPE I : (A)M et (B)N possèdent  
2 motifs antigéniques différents



TYPE II : (A)MY et (B)MX possèdent  
1 motif commun antigénique  
2 motifs différents non révélés



TYPE III : (A)MN et (B)MX possèdent  
1 motif commun antigénique  
2 motifs différents dont 1 antigénique  
l'autre non révélé



TYPE IV : (A)MI et (B)OP possèdent  
2 fois 2 motifs antigéniques diffé-  
rents



D. HEXOSAMINES LIEES AUX GLYCOPROTEINES RESISTANTES  
A LA DESPECIFICATION

-:-:-

Pourquoi notre attention fut-elle attirée plus particulièrement sur le comportement des glycoprotéines plasmatiques ? Les différences observées entre plasma de boeuf et plasma de veau ne pouvant, à notre sens, être rapportées qu'aux complexes protéiques dont l'architecture a les plus grandes probabilités de varier au cours de l'âge.

On peut penser, en effet, que les holoprotéines ont une configuration identique et que, par suite, leur devenir sous l'action du formol et de la chaleur demeure équivalent quel que soit l'âge de l'animal, ces holoprotéines étant régulièrement renouvelées par l'organisme (sous réserve, comme nous le verrons ultérieurement, de l'existence particulière chez le veau d'une protéine spéciale : la fétuine). Par contre, les protéines complexes, assurant un rôle de transport ou représentant des déchets tissulaires (alpha-globulines, par exemple) subissent au cours du vieillissement de l'être des modifications quantitatives appréciables et parfois qualitatives. Il



nous fallait nous intéresser spécialement aux lipoprotéines et glycoprotéines.

Cependant, les essais préalables nous ont montré que les lipoprotéines demeurent aisément dissociables ; nous nous sommes attaché à rechercher si les glycoprotéines ne subissent pas, au cours du traitement imposé au plasma, une dégradation dont l'allure serait parallèle à la perte d'antigénicité. C'est pourquoi nous nous sommes intéressé plus spécialement aux hexosamines liées aux protéines persistantes dans les échantillons de plasmas et aux sucres réducteurs qui sont libérés pendant la despécification.

En opérant comme il fut dit précédemment, nous avons mis en évidence sur 6 échantillons de plasma de boeuf et 6 échantillons de plasma de veau une évolution très significative que récapitule le tableau VI et que suggère visuellement la fig. 22.

On peut constater un arrêt de l'évolution des glycoprotéines du boeuf à partir de 77° C où l'action thermique n'a plus d'effet. Par contre, les glycoprotéines du veau sont sensibles à la chaleur entre 77° C et 110° C où l'on observe une libération progressive d'hexosamines.

#### TABLEAU VI

(voir page suivante)

Pourquoi notre attention fut-elle attirée plus particulière-  
 ment sur le comportement des glycoprotéines plasmatiques ? Les  
 différences observées entre plasma de boeuf et plasma de veau  
 ne pouvant, à notre sens, être rapportées qu'aux complexes pro-  
 téiques dont l'architecture a les plus grandes probabilités de  
 varier au cours de l'âge.

On peut penser, en effet, que les holoprotéines ont une  
 configuration identique et que, par suite, leur devenir sous  
 l'action du formol et de la chaleur demeure équivalent quel  
 que soit l'âge de l'animal, ces holoprotéines étant réguliè-  
 rement renouvelées par l'organisme (sous réserve, comme nous le  
 verrons ultérieurement, de l'existence particulière chez le  
 veau d'une protéine spéciale : la bêtaïne). Par contre, les  
 protéines complexes, assurant un rôle de transport ou repré-  
 sentant des déchets tissulaires (alpha-globulines, par exemple)  
 subissent au cours du vieillissement de l'être des modifica-  
 tions quantitatives appréciables et parfois qualitatives. Il

D. HEXOSAMINES LIÉES AUX GLYCOPROTEINES RESISTANTES  
 A LA DESPECIFICATION

TABLEAU VI

HEXOSAMINES LIEES AUX GLYCOPROTEINES

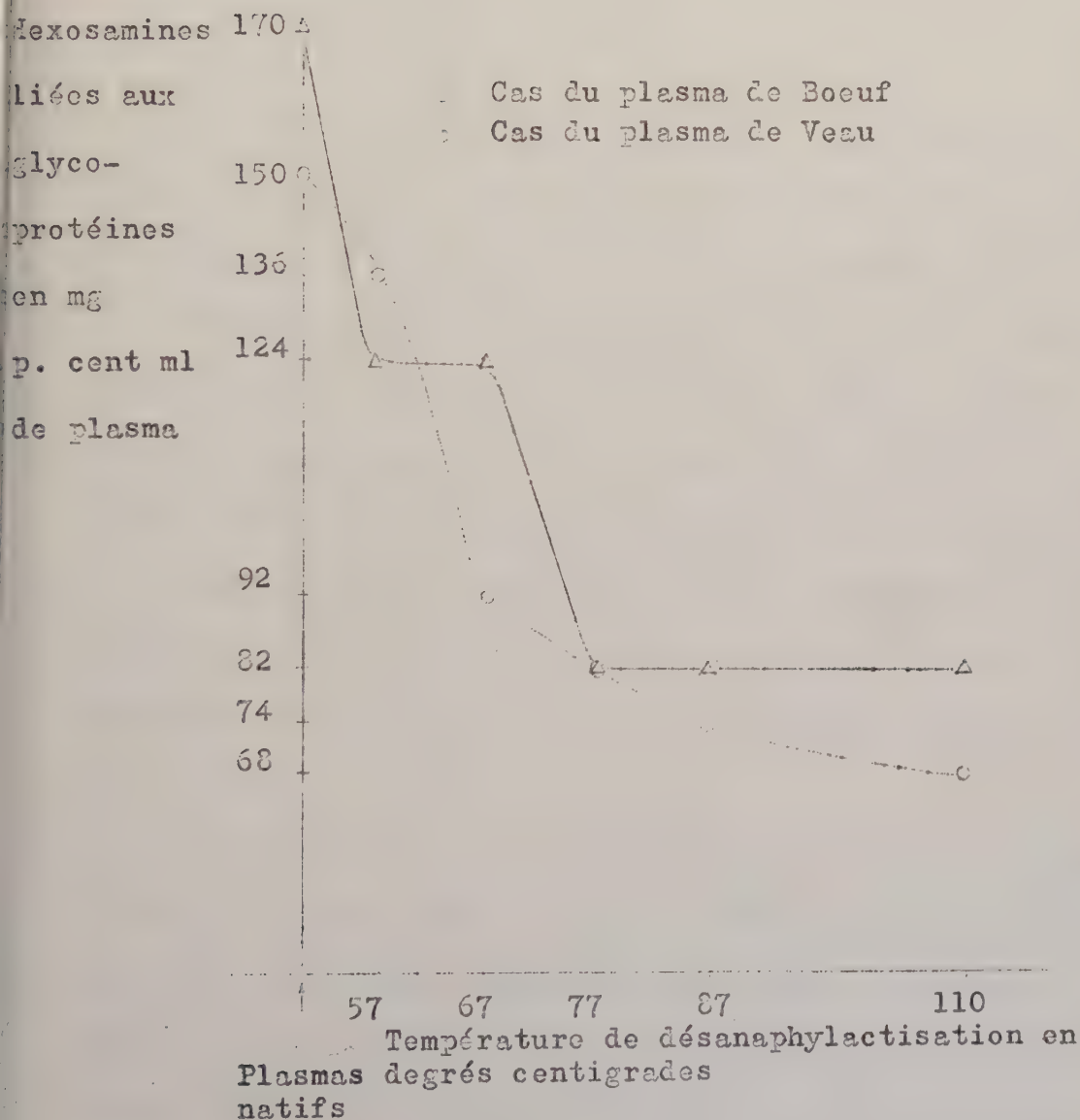
en fonction de la température de désanaphylactisation

| Plasma      | Hexoses en mg/100 ml |
|-------------|----------------------|
| de boeuf Bn | 170                  |
| B57         | 124                  |
| B67         | 124                  |
| B77         | 82                   |
| B87         | 82                   |
| B110        | 82                   |
| de veau Vn  | 150                  |
| V57         | 136                  |
| V67         | 92                   |
| V77         | 82                   |
| V87         | 74                   |
| V110        | 68                   |



Fig. 22

COURBE D'HEXOSAMINES LIEES AUX GLYCOPROTEINES  
en fonction de la température  
de désanaphylactisation





## E. SUCRES REDUCTEURS LIBERES PENDANT

### LA DESPECIFICATION

-:-:-

Les résultats de ces dosages sont restitués dans le tableau VII et la fig. 23. Pour le cas du plasma de boeuf, nous constatons qu'il y a libération de sucres réducteurs déjà à 57° C mais cela ne va pas plus loin jusqu'à 67° C. Ce n'est qu'à partir de 77° C qu'il y a libération nouvelle de sucres sans toutefois que le palier 182 mg pour cent soit dépassé, même pour la plus haute température de désanaphylactisation.

Pour le cas du plasma de veau, la libération des sucres réducteurs est toujours croissante avec la température de désanaphylactisation, en accusant une légère résistance entre 57 et 67° C.

Il est intéressant de rapprocher les courbes d'hexosamines liées aux glycoprotéines avec les courbes de sucres réducteurs. On voit, d'une part, le parallélisme entre les paliers d'hexosamines et de sucres réducteurs dans le cas des plasmas de boeuf. D'autre part, pour le cas des plasmas de veau, quand la température de désanaphylactisation augmente, il y a diminution du



taux d'hexosamines, ceci semble expliquer la libération croissante des sucres réducteurs en fonction de la température de désanaphylactisation.

TABLEAU VII

SUCRES REDUCTEURS

en fonction de la température de désanaphylactisation

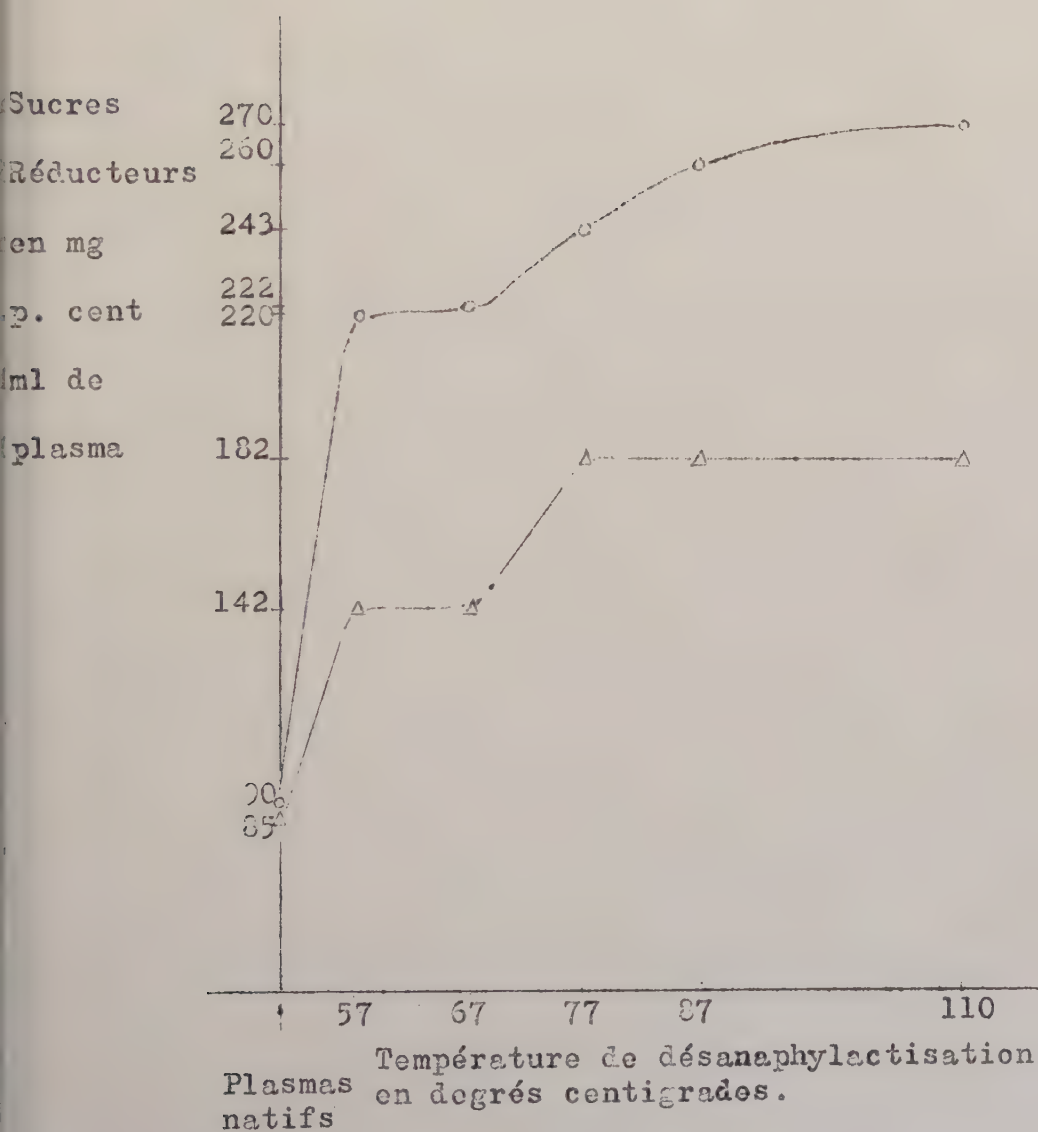
| Plasma      | Sucres réducteurs en<br>mg/100 ml |
|-------------|-----------------------------------|
| de boeuf Bn | 85                                |
| B57         | 142                               |
| B67         | 142                               |
| B77         | 182                               |
| B87         | 182                               |
| B110        | 182                               |
| de veau Vn  | 90                                |
| V57         | 220                               |
| V67         | 222                               |
| V77         | 243                               |
| V87         | 260                               |
| V110        | 270                               |



Fig. 23

COURBE DES SUCRES REDUCTEURS  
en fonction de la température  
de désanaphylactisation

○ Cas du plasma de Veau  
△ Cas du plasma de Boeuf





4ème Partie

D I S C U S S I O N   D E S   R E S U L T A T S

---



## A. RAPPEL DES RESULTATS OBTENUS

-:-:-

Cette étude nous a permis de constater les faits suivants :

1. Disparition progressive de l'antigénicité native de 60 à 110°C.
2. Atteinte d'une disparition totale de cette antigénicité dans le cas du plasma de veau.
3. Naissance d'une antigénicité nouvelle maximale à 77° C pour le plasma de boeuf, à 67° C pour le plasma de veau.
4. Disparition totale de l'antigénicité nouvelle à 110° C pour le plasma de veau - ces résultats étant obtenus par une étude sérologique, confirmée par l'immuno-électrophorèse.
5. Augmentation des sucres réducteurs libres à partir de 67° C : dissociation corrélative des hexosamines se poursuivant pour le plasma de veau, mais cessant dès 77° C, 87° C pour le plasma de boeuf.

Ces résultats rendent compte du bien-fondé de l'hypothèse initiale de notre travail selon laquelle le paramètre "origine du plasma" devait jouer un rôle déterminant.



### B. MECANISME DE LA DESPECIFICATION

--:--

Mais avant de conclure, nous comparerons nos résultats avec ceux d'Ardry et Elie qui ont étudié le mécanisme de despécification selon un protocole de conductimétrie inspiré de Loiseleur (63). Cette étude nous a, en effet, suggéré les différents paliers thermiques de 57, 67, 77, 87, 110° C où l'on note des modifications conductimétriques (77), affectant les groupes polaires qui sont directement en rapport avec les propriétés immunologiques.

En effet, les auteurs ont signalé avant 57° C deux stades : la méthylénisation et l'hydratation :

1. La méthylénisation se manifeste avant 45° C, où il y a fixation du formol sur le groupe amine selon la réaction classique :



2. L'hydratation qui se réalise vers 45-55° C où une molécule d'eau se fixe sur chaque groupe méthylénique pour former un groupe monométhylol  $\text{R} - \text{NH} - \text{CH}_2\text{OH}$  doué de propriété basique.

3. La peptisation est le stade le plus important, s'effectuant vers 60-75° C, où il y a formation de nouvelles molécules protéiques.

Au point de vue conductimétrique, on note une diminution



simultanée du nombre de groupes acides et basiques que peut légitimer l'interaction d'un groupe acide sur le groupe basique monométhylol.

Au point de vue immunologique, nous avons constaté qu'il y a, à cette zone de chauffe, un clocher d'antigénicité nouvelle dont les molécules nouvellement formées sont très vraisemblablement responsables.

4. La scission des ponts peptidiques a lieu vers 70-85° C où il y a libération des groupes acides et basiques.

5. La cyclisation où la recombinaison s'installe au-dessus de cette température : le nombre de groupes acides et basiques diminue.

C'est à 110° C qu'on a le plus de chance de voir les protéines perdre leur structure originelle tant dans leur forme moléculaire qu'au niveau des motifs aminés. Ceci explique la disparition de l'antigénicité native.

L'atténuation ou la disparition de l'antigénicité nouvelle accusant un maximum à 67° C pour le plasma de veau, 77° C pour le plasma de boeuf, s'explique par le fait que la molécule protéique n'est plus porteuse de charge électrique, du fait de la saturation de la plupart ou la totalité de ses groupes acides et basiques mis en liberté depuis le stade de peptisation ; la saturation, ayant lieu au stade de cyclisation, explique la perte d'ionisation, par conséquent la perte d'antigénicité nouvelle.



Autrement dit, si une antigénicité persiste, qu'elle soit native ou nouvelle, c'est qu'il reste encore des groupements basiques -  $\text{NH}_2$  qui n'ont pas été méthylénisés durant la formation, bien qu'ils soient par la suite fixés par les -  $\text{COOH}$ .

En effet, au sein de la structure complexe de la protéine, on peut concevoir une disposition interne ou mieux intramoléculaire des groupements aminés des acides diamminés ou du tryptophane. La probabilité de fixation de la formaldéhyde par ces groupes polaires "secondaires" demeure très petite et il apparaît comme très vraisemblable que ce sont précisément ces groupes qui portent la responsabilité du maintien d'un certain degré d'antigénicité.

Certes on peut se demander toutefois comment ces groupes inaccessibles à la formaldéhyde deviennent accessibles à un quelconque enchaînement peptidique lors de la synthèse de l'anticorps ou lors de l'impression effectuée sur les nucléoprotéines protéinoformatrices. Il y a lieu de penser, croyons-nous, à une action de répartition des charges électroniques, la présence interne d'un ou plusieurs groupements - $\text{NH}_2$  retentissant nécessairement dans la disposition des orbitales externes alors qu'un groupe complexé par la formaldéhyde et non ionisé n'aurait point de tel retentissement. Il s'agirait donc d'une action indirecte mais néanmoins effective.

D'une manière générale, nous avons observé, durant tout le chauffage, le clivage de molécules protéiques, entre autres,



avec libération des sucres réducteurs. Le comportement du plasma de boeuf accuse 2 paliers : de 57° C à 67° C, d'une part, de 77° C à 110° C, d'autre part. Dans le cas du plasma de veau, le phénomène est constamment progressif depuis 57° C à 110° C et très vraisemblablement encore au-delà de 110° C.

### C. ROLE PROPRE DES GLYCOPROTEINES

-:-:-

On ne peut, toutefois, nier qu'il reste des protéines à polyosides non touchées par la despécification. En effet, le plasma de boeuf natif présente un taux d'hexosamines de départ de 170 g. p. 1000, et un taux de 62 g p. 1000 une fois despécifié, soit un restant de 48 % d'hexosamines. Le plasma de veau présente un taux d'hexosamines de départ de 150 g p. 1000 et un taux de 68 g p. 1000 une fois despécifié, soit un restant de 43 % d'hexosamines.

Et l'on pourrait se demander quel serait le comportement antigénique de ces protéines à polyosides récalcitrantes à la despécification. Il faut bien admettre que leur antigénicité est extrêmement faible, sinon inexistante.

Selon le protocole de nos expériences, ceci est dû vraisemblablement au fait que leurs sites antigéniques ne sont pas apparents.



L'étude d'un enzyme hydrolysant ces glycoprotéines (78, 79) résistantes à l'action de la formaldéhyde et de la chaleur pourrait être l'objet d'un autre travail. Mais l'adjonction d'un tel enzyme ne risque-t-elle point de compromettre l'incuité du produit en introduisant une nouvelle source d'antigénicité, sinon des substances pyrogènes ?

#### D. IMPORTANCE DE L'EMPLOI DU PLASMA DE VEAU

-:-:-

Elle résulte des tableaux et des faits précédemment rapportés. Sur le plan théorique, il y a lieu de penser soit à l'existence moins abondante des familles protéiques dans les grands groupes Albumine, Alpha, Eêta, Gamma-globulines classiquement répertoriés, soit à la probabilité d'un moins grand nombre de liaisons  $-CO-NH-$ . Cette hypothèse, à laquelle nous souscrivons plus volontiers, rendant compte tout à la fois de la plus grande "flexibilité" des structures protéiques et d'un plus grand nombre de groupes polaires, toutes raisons militant en faveur d'une despécification plus aisée puisque celle-ci résulte à la fois d'un blocage des motifs polaires antigéniques et d'une variation de structure. Nous y reviendrons.

L'étude axée sur le parallélisme entre le plasma de boeuf et le plasma de veau, trouve en effet sa justification dans



les travaux de Pedersen (30). Celui-ci a démontré qu'il y a un taux de globulines plus important chez l'animal adulte que chez l'animal jeune. En effet, par ultra-centrifugation et précipitation par le sulfate d'ammonium dans des conditions particulières, cet auteur a isolé une nouvelle protéine de densité différente des autres connues antérieurement. Chez le veau, cette protéine atteint de 5 à 20 % des protides totaux selon l'âge; ce taux décroît au fur et à mesure que l'animal grandit. Cette protéine est dénommée : fétuine.

Peu de travaux ont été faits sur cette fraction. Quelques publications, basées sur la séparation électrophorétique, précisant en plus que la fraction gamma-globulinique existe en faible quantité chez le jeune animal.

Il importe de préciser que cette hypogammablobulinémie chez un jeune animal est de règle dans des conditions physiologiques normales (\*). En général, si l'on élimine les cas particuliers

---

(\*) On note cependant quelques cas discordants, d'ailleurs explicables. D'une part Osborn qui a fait paraître plusieurs travaux sur l'immunité du nouveau-né (31) conclut de ses expériences de vaccination antitétanique et antidiphtérique que le nourrisson est capable de fabriquer des anticorps. On a eu aussi l'occasion de déterminer le taux des gamma-globulines chez le nourrisson souffrant de péritonite à staphylocoques et on l'a trouvé fort élevé (32). On a observé même, chez un prématuré né 3 semaines avant terme, l'absence d'agglutinines antityphiques alors que la mère atteinte d'une typhoïde avait à ce moment un séro-diagnostic de Vidal positif (33, 34). Le prématuré, séparé aussitôt de sa mère, fut nourri au biberon. Un mois plus tard, le sérum du prématuré agglutinait le bacille typhique, preuve du passage de l'antigène typhique à travers le placenta, et surtout de la production d'anticorps chez le nouveau-né.



de vaccination, d'imprégnation placentaire, pour ne considérer que les conditions physiologiques normales, on a toute chance d'observer une hypogamma-globulinémie chez le jeune animal (35).

Quant à la transformation de la fétuine, nous pouvons émettre au moins trois hypothèses :

1. hypothèse d'une protéine transitoire à architecture moins fixée, n'ayant pas de rôle de transport à jouer, mais ayant un rôle oncotique,
2. hypothèse d'une protéine métabolite, précurseur des autres protéines dont les forces d'interaction assurant la rigidité du modèle seraient moindres,
3. hypothèse la plus simple : celle d'une protéine à faible poids moléculaire, ayant par conséquent peu d'enchaînements - CONH - et, par suite, beaucoup plus de groupements polaires sensibles à l'action de la formaldéhyde.

Nous retrouvons d'ailleurs ici le bénéfice d'une vaste expérimentation espagnole faite à partir de la matière première qui abonde dans ce pays, par un heureux hasard, et qui est du plasma de veau. Jusqu'en 1955, dix-huit tonnes de plasma de veau despécifié ont été transfusées (36).

Nous insistons sur ce fait capital dans la despécification du plasma de veau. Nous avons vu précédemment que l'antigénicité nouvelle du plasma de veau atteint son maximum à 67° C de désanaphylactisation. Celle du boeuf présente un maximum de danger quatre fois plus grand à 77° C. Arrêter une préparation



aux environs de ces températures, et surtout quand on travaille avec du plasma de boeuf, serait une grave erreur. Ceci expliquerait, à notre sens, les accidents observés au Portugal et restés jusqu'ici incompréhensibles, les auteurs portugais ayant transposé la technique espagnole (lassons) sans considération préalable de la nature exacte de la matière première (en l'occurrence substitution du plasma de bovin adulte au plasma d'animal jeune).

Une désépécification, même bien menée dans ses différents stades, n'est jamais exempte d'antigénicité native ou nouvelle si l'on n'accorde pas une importance dans le choix de la matière première à désanaphylactiser.

Notons enfin que, sur le plan pratique, il y aurait lieu, en outre, de veiller à retenir uniquement les animaux à jeun pour avoir une faible teneur de leur sang en lipides.

#### E. DISCUSSION SUR LE TERME DESPECIFICATION

-:-:-

Ce terme, avons-nous dit, fut très controversé. De nombreux auteurs niant la disparition totale de l'antigénicité. Ceux-ci ont raison s'ils envisagent les résultats pratiques généralement publiés. Ils ont tort s'ils se placent sur un plan doctrinal général, puisque nos résultats viennent démontrer l'absence réelle d'antigénicité native et nouvelle.



Il ne manquera pas d'intérêt de s'étendre sur ce point et, tout d'abord, de définir le terme "despécification" et de préciser les conditions d'antigénicité : on entend par despécification un arrangement physique ou intramoléculaire, plutôt qu'une altération chimique de la structure de la protéine native, qui conduit à une transformation de sa configuration spatiale, sans hydrolyse des liaisons primaires covalentiellles (37). Le diagramme d'électrophorèse libre des plasmas despécifiés à une température inférieure à 90° C montre l'existence de deux familles protéiques (38). C'est seulement après chauffage à 110°C que l'on pourra observer les deux fractions accolées en un pic hétérogène à mobilité supérieure à celle de l'albumine, l'image représentant le terme ultime de la despécification, pour un plasma donné, son origine étant relative au modelage de ce pic.

Une telle protéine despécifiée n'est plus un antigène possible. En effet, l'antigène est un ensemble de structure générale avec des motifs particuliers. Ceux-ci sont des sites antigéniques réels, mais ne peuvent donner d'anticorps s'ils ne sont point véhiculés par un corps de structure satisfaisante. Il faut que l'impression de l'antigène dans les milieux protéino-formateurs soit possible, suffisante et soutenue. C'est là la source du problème des adjuvants.

Donc, trois points sont à discuter : structure générale, sites antigéniques (et particulièrement état des groupes polaires), adjuvants.



La discussion sur la structure et les sites se borne aux conceptions déjà évoquées d'une plus grande habilité des protéines de veau.

L'emploi des adjuvants, très valable sur le plan de l'information pure et du développement de nos connaissances, faussera le problème sur le plan physiologique. Nous suggérons la distinction entre immunisation absolue et immunisation physiologique, c'est-à-dire, un animal peut très bien supporter une structure donnée à des taux déterminés, alors qu'une surcharge ou une déformation momentanée peut devenir toxique. Ceci est comparable, en quelque sorte, à l'emploi des produits toxiques à forte dose et présentant des synergies avec divers composants. Le pharmacien sait alors proscrire la juxtaposition d'éléments risquant de fausser les règles de la posologie courante. Il sait aussi observer celle-ci. Telle devrait être la règle pour certains produits biologiques dont le discrédit procède seulement d'une étude trop absolue en l'occurrence. Encore une fois, regrette-t-on l'emploi de l'acide acétylsalicylique, de l'arrhénal, de la novocaïne, etc..., car si l'on veut pousser jusqu'à l'extrême, tout corps étranger au fonctionnement d'un organisme lui est antigénique. Et même certains corps utilisés dans son fonctionnement le seraient, quelle que soit la nature : minérale, organique ou protéinique (87).

Il importe de préciser, d'autre part, que l'immunisation sur laquelle repose cette étude est un phénomène uniquement ex-



périmental. La technique d'immunisation utilisée est faite par voie intraveineuse et par adsorption sur alumine. Les animaux ont reçu en 93 jours 16 injections au total allant de 10 mg à 750 mg de protéines. Nous n'avons observé aucune réaction anaphylactique chez les animaux ayant reçu du plasma convenablement despécifié, malgré les conditions sévères d'immunisation. Jamais on ne trouvera un transfusé placé dans de pareilles conditions de sensibilisation.

Nous avons craint cependant que nos immunsérums ne soient pas assez actifs, et nous nous sommes adressés aux adjuvants lipidiques, selon une variante de type Freund, et nous n'avons pas obtenu d'immunsérums plus actifs. Cette preuve fortifie notre position (\*).

---

(\*) La technique d'immunisation que nous avons adoptée a été appliquée avec succès aux recherches des parentés immunologiques des protéines urinaires de rats soumis au régime de néphrite à la cellophane et aux injections de bêta-gamma-globulines anti-rein (90):

L'immunisation a été faite sur 4 lapins de 2 kg environ, avec l'adjuvant lipidique de composition suivante :

Huile de paraffine ..... 1 ml  
Aquafor fondu ..... 0,1 ml  
Bacilles tuberculeux tués (poudre de culture) 0,01 g.

Une première série d'injections intramusculaires (IM) fut faite sous l'épaule, une deuxième série en intraveineuses (IV), selon ce rythme, à ces doses pour un lapin :

1ère semaine ..... 1 IM de 3 mg de protéines + 1 ml d'adjuvant  
2ème semaine ..... 1 IM de 6 mg de protéines + 1 ml d'adjuvant  
3ème semaine ..... repos  
4ème semaine ..... repos  
5ème semaine ..... 1 IM de 12 mg de protéines + 1 ml d'adjuvant  
6ème semaine ..... repos  
7ème semaine ..... 3 IV de 3 mg de protéines  
8ème semaine ..... 3 IV de 6 mg de protéines  
9ème semaine ..... 3 IV de 12 mg de protéines.

Le prélèvement des immunsérums fut effectué le 3ème jour après la dernière injection.



Pour vérifier le problème sous tous ses aspects, nous avons déspecifié du sérum humain et nous avons étudié le produit final avec l'immunsérum équin anti-humain total de l'Institut Pasteur (Chefal 513). Avec un sérum humain normal, cet immunsérum peut révéler de 18 à 21 fractions protéiques. Avec le sérum humain déspecifié, cet immunsérum n'a révélé aucune fraction protéique. Cela prouve que tout a été bien déspecifié.

Nous pouvons donc avoir confiance en notre technique de déspecification et nous ne pouvons rien reprocher à la qualité des immunsérums préparés pour ces travaux d'immunologie.

#### F. FORMES HOMO ET ALLOTYPIQUES

--:--

D'autre part, il faut rappeler les réactions allergiques avec le plasma humain lyophilisé.

La lyophilisation lèse quelque peu les lipoprotéines, ce qui pourrait engendrer de nouveaux antigènes sériques.

Le plasma humain lui-même est l'objet d'une multispécificité très variable d'un sujet à l'autre. A cet effet, dans une communication extrêmement importante de J. Oudin, lors du dernier colloque d'immunologie de 1959 (91), l'auteur a pu démontrer le danger d'une immunisation à partir du sérum de lapin sur les lapins. Ce résultat nouveau et inattendu révèle une multispécificité d'un même antigène conçue sous deux formes :



- . Forme homotypique, celle qui ne varie pas chez les individus d'une même espèce,
- . Formes allotypiques, celles qui varient d'un individu à l'autre (d'une même espèce).

La découverte des motifs allotypiques, fonction des facteurs génétiques et pathologiques, explique certains échecs des homogreffes.

Elle pose un nouveau problème à la transfusion du plasma homologue, sous l'angle d'immunisation allotypique, vu la complexité des facteurs génétiques incontrôlables et pathologiques non révélés.

D'une manière générale, l'électrophorèse d'un sérum nous montre une hétérogénéité de 6 pics; l'immunoélectrophorèse nous en révèle 23 fractions (92) qui sont d'ailleurs inconstantes selon certains sérums et certains immunsérums pourtant préparés de la même manière

Autrement dit, plusieurs immunsérums préparés avec le même antigène sur des animaux différents peuvent être différents. Plusieurs antigènes d'une même espèce ne donnent pas toujours une précipitation identique à un même immunsérum préparé avec un antigène de cette même espèce. Ceci confirme la conception de l'allotypie.

Donc, transfuser un plasma homologue c'est transfuser une multispécificité; transfuser un plasma despécifié c'est transfuser une unispécificité, au maximum, car celui-ci ne présente



qu'un seul pic à l'électrophorèse, et cette unispécificité est certainement bien peu antigénique du fait qu'il n'y a plus de groupes polaires antigéniques, la structure étant complètement modifiée et les groupes polaires liés ou saturés (93).

D'une manière ou d'une autre, nous ne trouvons pas plus dangereuse une transfusion de plasma hétérologue convenablement déspecifié que celle d'un plasma homologue, la sensibilisation ne pouvant, en effet, pas se produire car les doses injectées directement dans la circulation sanguine sont bien trop fortes et elles établissent à coup sûr une paralysie immunitaire automatique.

+

+

+



## C O N C L U S I O N S

-:-:-

Les besoins d'une grande nation en produits de remplacement du plasma sanguin peuvent surgir rapidement. Aussi est-il nécessaire d'envisager les moyens de préparer un succédané pratique, efficace, peu coûteux et non toxique. Ces caractères appartiennent au plasma de boeuf. Toutefois, sa non-toxicité demeurerait controversée.

Dans le présent travail, nous nous sommes attachés à montrer qu'il pouvait exister de nombreux types de plasmas despécifiés, c'est-à-dire divers types selon l'origine du plasma et la température de chauffage, et que parmi ces types il en est qui sont absolument inoffensifs alors que d'autres peuvent être très toxiques. Ceci légitime tout à la fois les inquiétudes de certains et les assurances des autres.

Nous avons donc étudié, en fonction de la température de chauffage, le comportement du plasma formolé de boeuf et de veau.

Ces recherches ont été conduites grâce à des techniques d'investigation d'ordre

- biologique, lors de l'immunisation des animaux,



- sérologique, par une réaction de déviation du complément, type Kolmer,
- immuno-électrophorétique, par une ultra-microméthode personnelle après vérification du rapport de la zone d'équivalence par la microtechnique d'Ouchterlony,
- chimique, par l'étude de la dissociation des glycoprotéines.

Les résultats de ces diverses voies d'exploration convergent, comme en témoignent les constatations suivantes :

- disparition progressive de l'antigénicité native avec la température de despécification,
- apparition d'une antigénicité nouvelle réelle,
- disparition de ces antigénicités d'une manière totale à  $+110^{\circ}$  C pour le plasma de veau.

En conclusion, il nous apparaît que la despécification, c'est-à-dire la perte des caractères d'espèce, peut être réellement obtenue par les moyens utilisés dans notre étude, ainsi que le prouve d'ailleurs l'observation d'un plasma humain traité dans les mêmes conditions.

La thérapeutique peut donc s'enrichir sans crainte d'un produit "essentiellement" valable.



B I B L I O G R A P H I E

-:-:-

1. Journées Transfusionnelles 12 et 13 Sept. 1953 Genève ;  
Edit. Médecine & Hygiène, Genève.- Ve Congrès International  
de Transfusion Sanguine 13 au 19 Sept. 1954, Paris ; Edit.  
Croutzet, Paris.
2. Statistique du C.N.T.S., 6 rue Alexandre Cabanel, Paris 15e.
3. ALBOUZE (G.).- Etude d'une nouvelle gélatine fluide modifiée  
comme substitut du plasma, Thèse Doct. en Méd., Paris 1956.
4. CUDIN (J.).- Colloque d'immunologie à l'Institut Pasteur,  
11 Juin 1959, sous presse
5. THEILLEUX (R.), ARDRI (R.) et Coll.- Rev. du Corps Vét. de  
l'Armée, 1955, 3, pp. 110-126.
6. RAMOS (R.) et OPPENHEIMER (W.).- Rev. Esp. Pediatr., 1946,  
2, p. 162.
7. KOECHER (P.H.), HANSEN (H.G.) et BURKERT (E.).- Arch. de  
Pédiâtrie, E. Klin. Wschr., 1954, 32, p. 311.
8. FUSTER (R.).- Rev. Esp. obst. y Ginec., 1951, 10, p. 237.
9. COULOT (M.).- Premiers essais d'un plasma hétérologue despé-  
cifié dans le traitement de la cirrhose alcoolique, Thèse  
Doct. Méd., Lyon 1953 ; Edit. Bosc, Lyon.
10. PERROT (E.).- Rapport au Congrès de Transfusion d'Alger, mars  
1953, citée par STORCK (J.), Contribution à l'étude des pro-



- téines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur.  
Thèse de Pharmacie, Paris 1954; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
11. CORDIER (G.), DEMIRLEAU (J.) et OUNAIS (J.).- Bull. Hop. Sadiki, Tunis 1945, 3, p. 115 ; Edit. I. Aloccio, Tunis.
12. CONN (E.J.) et Coll.- MUDDS et THALHIMER (W.).- Blood Substitutes and Blood Transfusion. Ch. C. Thomas Ed., Springfield, 1942, p. 173.
13. ERIKSON (J.O.) et NEURATH (H.).- J. Exptl. Med., 1943, 78, p.1.
14. ERIKSON (J.O.) et NEURATH (H.).- J. Gen. Physiol. 1945, 28, p. 421.
15. MARTIN (D.S.), ERIKSON (J.O.), PUTNAM (F.W.) et NEURATH (H.).- J. Gen. physiol. 1943, 26, p. 533.
16. CAMPBELL (D.H.) et CUSHING (J.E. Jr).- Science, 1945, 102, p. 546.
17. WRIGHT (G.G.).- J. Exptl. med., 1944, 79, p. 455.
18. RAMON (G.).- Ann. Inst. Pasteur 1935, 39, p. 1.
19. LUCAS (J.).- Thèse doct. vétér., Alfort, 1939, citée par STORCK (J.), Contribution à l'étude des protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur ; Thèse de Pharmacie, Paris 1954 ; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
20. MERIEUX (Ch.).- C.R. Soc. Biol. 1943, 137, p. 554.
21. MERIEUX (Ch.).- Bull. Acad. Méd. 1946, 28, p. 506.
22. MERIEUX (Ch.), BRUNAUD (M.) et PIERRE (M.).- Rev. path. Comp., 1950, 4, p. 60.
23. MERIEUX (Ch.).- Bull. Inst. Pasteur, 1947, 66, p. 563.



24. EDWARDS (F.D.).- Brit. Med. J., 1944, 1, p. 73.
25. MASSONS (J.M.).- Annal. Inst. Nat. Cienc. Med., 1944, 3, p.449.
26. MASSONS (J.M.).- Lancet, 1946, 7, p. 341.
27. MASSONS (J.M.).- Rapports et Communications du IVe Congrès International de Transf. Sanguine de Lisbonne (1951). Edit. Exp. Scient. Fr., Paris 1952, p. 243.
28. VALDECASAS.- Confér. Faculté de Méd. de Paris, 12 Mars 1954, d'après MASSONS (J.M.), Ve Congrès International de Transf. Sanguine, Paris 1955, pp. 984-991.- Edit. Croutzet, Paris.
29. COULOT (M.).- Premiers essais d'un plasma hétérologue despécifié dans le traitement de la cirrhose alcoolique, Thèse Doct. Méd., Lyon 1953, p. 15 ; Edit. Bosc, Lyon.
30. HIRTZ (J.).- Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, 35, p. 859.
31. LARGET (M.), COULOT (Y.) et Mlle DEBAT (J.).- Presse Méd. 1952, 12, p. 446.
32. LARGET (M.) et COULOT (Y.).- Rapport transmis à la Commission des Médicaments ..., 1952.- Citée par STORCK (J.), Contribution à l'étude des protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur ; Thèse de Pharmacie, Paris 1954 ; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
33. LARGET (M.) et COULOT (Y.).- J. Intern. Chir. 1953, 12, p. 446.
34. LARGET (M.) et COULOT (Y.).- Rapports Journées Transf. Genève, 1953, pp. 83-87 ; Edit. Médecine et Hygiène, Genève.
35. ENGELHARDT (A.).- Rapports Journées Transf. Genève, 1953, p. 122 ; Edit. Médecine et Hygiène, Genève.



36. KAWAISHI (K.).- Hiroshima J. Méd. Sci., 1952, 1, p. 97.
37. PONTECORVO (M.).- Riv. Ist. Sérolog. Ital. 1948, 23, p. 160.
38. COULOT (M.).- Premiers essais d'un plasma hétérologue despécifié dans le traitement de la cirrhose alcoolique, Thèse Doct., Méd., Lyon 1953, p. 33 ; Edit. Bosc, Lyon.
39. EDWARDS (F.R.).- Brit. Med. J., 1944, 1, p. 73.
40. ENGELHARDT (A.). Rapports Journées Transf. Genève, 1953, p. 123 ; Edit. Médecine et Hygiène, Genève.
41. KAWAISHI (K.).- Hiroshima J. Méd. Sci., 1952, 1, p. 97.
42. MASSONS (J.M.).- Rapports et Communications du IVe Congrès International de Transfusion Sanguine de Lisbonne, 1951, p. 243 ; Edit. Exp. Scient. Fr., Paris.
43. PONTECORVO (M.).- Riv. Ist. Sérolog. Ital., 1948, 23, p. 160.
44. EYQUEM (A.), GRABAR (P.) et PERROT (H.).- Vox Sanguinis, Amsterdam, 1954, 4, p. 29.- Citée par STORCK (J.), Contrib. à l'Etude des Protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur, Thèse de Pharmacie, Paris 1954; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
45. GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A.).- Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, p. 193 - 1955, 17, p. 67.
46. SCHEIDEGGER (J.J.) et BUZZI (C.).- Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 1957, 2, p. 904.
47. Pharmacopée Française, 1959, p. 653.
48. ENSELME (J.) et TIGAUD (J.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1954, 36, p. 815.



49. ARDRY (R.).- Ann. Biol. clin., 1949, 7, p. 407.
50. ARDRY (R.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 32, p. 375.
51. ARDRY (R.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1950, 32, p. 1924.
52. ARDRY (R.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1951, 33, p. 236.
53. ARDRY (R.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1951, 33, p. 242.
54. ARDRY (R.).- Bull. Soc. Chim. biol., 1951, 33, p. 543.
55. ARDRY (R.), STORCK (J.) et THEILLEUX (R.).- Comm. Congrès Transfusion Alger, Mars 1953.- Citée par STORCK (J.), Contribution à l'étude des protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur, thèse de Pharmacie, Paris 1954; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
56. ARDRY (R.).- Ann. biol. clin., 1954, p. 12.
57. ARDRY (R.).- Rapport présenté à la commission du Codex, 1955.
58. Pharmacopée Française, 1949, p. 653.
59. STORCK (J.).- Contribution à l'étude des protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur, Thèse de Pharmacie, Paris 1954, p. 50 ; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
60. EDWARDS (F.R.).- Brit. Med. J., 1944, 1, p. 73.
61. EDSALL (J.T.).- Advances in Protein Chemistry, 1947, 3, p. 383 ; Edit. Academic Press, New York.
62. STORCK (J.).- Contribution à l'étude des protéines plasmatiques traitées par la formaldéhyde et la chaleur ; Thèse de Pharmacie, Paris 1954, p. 20 ; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
63. ARDRY (R.) et ELIE (G.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1956, 1, p. 129.



64. GRABAR (P.).- Techniques de laboratoire, 1947, p. 626 ;  
Edit. Masson, Paris.
65. GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.A.).- Biochim. Biophys. Acta, 1953,  
10, p. 193 ; 1955, 17, p. 67.
66. COURCON (J.) et URIEL (J.).- Ann. Biol. clin., 1953, 3, p. 181.
67. SCHEIDEGGER (J.J.).- IVe Jour. Biochim. Franco-Helvético-  
Hispano-Italiennes, 1957 ; Edit. Declume, Lons-le-Saunier.
68. NGUYEN-TRONG (T.) et ARDREY (R.).- Ann. Biol. clin., sous  
presse, 1959, 10-12, communication à la séance de Novembre 1958.
69. SCHEIDEGGER (J.J.) et BUZZI (C.).- Rev. Franç. Etudes clin.  
et biol., 1957, 2, p. 898.
70. GRASSET (E.), PONGRATZ (E.) et BRECHBUHLER (T.).- Ann. Inst.  
Pasteur 1956, 91, p. 162.
71. HARTMANN (L.) et TOILLIEZ (M.).- Rev. Franç. Etudes clin.  
et biol., 1957, 2, p. 197.
72. URIEL (J.) et SCHEIDEGGER (J.J.).- Bull. Soc. Chim. biol.,  
1955, 37, p. 165.
73. GRABAR (P.) et URIEL (J.).- Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90,  
p. 427.
74. MENINI (E.), FALFORT (W.) et LOUS (P.).- Acta Medica Scandi-  
navica, 1958, 4, p. 315.
75. FONTY (P.).- Ann. Biol. clin., 1950, p. 312.- Citée par  
LAGAILLARDE (J.), La Méthode Colorimétrique, pp. 137-139 ;  
Edit. Sophos, Aubervilliers-Paris.
76. ENSELME (J.) et TIGAUD (J.).- IVe Journées biochim. franco-



- helvético-hispano-italiennes, Montpellier 13-16 Mai 1957 ;  
Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 39, p. 1249.
77. LOISELEUR (J.).- Ann. Inst. Pasteur, 1955, 32, pp. 152-165.-  
Citée par ARDREY et ELIE, Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 1, p.129.
78. SCHULTZE (H.E.), FEIDE (H.) et MULLEN (H.).- Behringwerk-  
Mitteil, 1957, 32, 1.
79. SCHULTZE (H.E.) et SCHWICK (G.).- Behringwerk-Mitteil, 1957,  
33.
80. PEDERSEN (Kai O.).- "The Svedberg 1884-1944", p. 490.
81. OSBORN (J.) et Coll.- Pediatrics, 1952, 2, p. 736,  
10, p. 328 et 450.
82. MARTIN DU PAN (R.), SCHEIDEGGER (J.J.) et ROULET (H.).- Arch.  
Franç. Ped., 1953, 10, p. 1015.
83. HEEF (F.C.) et SCHWARTZ (E.S.).- Bull. Univ. Kansas Scholl  
Med., 1953, p. 10 ; Citée par UNGAR (J.).- Sem. Hôp. Paris,  
1956, 32, p. 359.
84. UNGAR (J.).- Sem. Hôp. Paris, 1956, 32, p. 329.
85. SCHEIDEGGER (J.J.) et MARTIN DU PAN (R.).- Etudes Néo-Natales,  
3, pp. 136-143.
86. MASSONS (J.M.).- IVth International Congress of blood transfusion  
1954, , p. 985 ; Edit. Croutzet, Paris.
87. PUTNAM (F.W.).- "The Proteins", 1953, pp. 807-933 ; Edit.  
Academ. Press, New York.
88. ARDREY (R.).- Etude électrophorétique des modifications des  
protéines sériques provoquées par le chauffage, la délipidation  
et l'action des corps tensionactifs : Thèse de Sciences, Paris



1953 ; Edit. Arnette, Paris.

89. LOISELEUR (J.).- Biol. méd., 1958, 3, pp. 259-342.

90. BAILLET (J.), ROBILLIART (L.), BRIOT (C.) et NGUYEN-TRONG (T.).-

Hôpital Broussais-La Charité, Service de Mr le Professeur de  
Gennes, Paris 1959.

91. CUDIN (J.).- Colloque d'immunologie à l'Inst. Pasteur, 11  
Juin 1959.

92. GRABAR (P.).- Colloque d'immunologie à l'Inst. Pasteur,  
11 Juin 1959.

93. AUBRY (R.) et ELIE (G.).- Bull. Soc. Chim. biol. 1956, 38,  
p. 136.



TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                  | Pages |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <u>Introduction</u> .....                                                                                        | 8     |
| <u>1ère partie : les plasmas despécifiés</u> .....                                                               | 13    |
| A. Evolution de la question .....                                                                                | 14    |
| B. Préparation du plasma despécifié .....                                                                        | 20    |
| C. Caractères généraux du plasma despécifié ...                                                                  | 26    |
| D. Caractères particuliers des plasmas traités,<br>destinés à l'étude des critères de despé-<br>cification ..... | 32    |
| <u>2ème partie : techniques d'investigations</u><br>personnelles .....                                           | 36    |
| A. Préparation des immunosérums .....                                                                            | 37    |
| B. Mise au point de l'ultra-microméthode<br>d'immuno-électrophorèse .....                                        | 41    |
| C. Dosages des hexosamines liées aux glyco-<br>protéines .....                                                   | 53    |
| D. Dosage des sucres réducteurs .....                                                                            | 56    |
| E. Réaction de déviation du complément,<br>type Kolmer .....                                                     | 60    |
| <u>3ème partie : résultats expérimentaux</u> .....                                                               | 63    |
| A. Etude sérologique des plasmas despécifiés ..                                                                  | 64    |
| B. Résultats de la technique de Micro-Ouchterlony                                                                | 69    |
| C. Résultats d'immuno-électrophorèse .....                                                                       | 75    |
| D. Hexosamines liées aux glycoprotéines résis-<br>tantes à la despécification .....                              | 87    |
| E. Sucres réducteurs libérés pendant la<br>despécification .....                                                 | 91    |
| <u>4ème partie : discussion des résultats</u> .....                                                              | 94    |
| A. Rappel des résultats obtenus .....                                                                            | 95    |
| B. Mécanisme de despécification .....                                                                            | 96    |
| C. Rôle propre des glycoprotéines .....                                                                          | 99    |
| D. Importance de l'emploi du plasma de veau ...                                                                  | 100   |
| E. Discussion sur le terme despécification ....                                                                  | 103   |
| F. Formes homo et allotypiques du plasma humain                                                                  | 107   |
| <u>Conclusions</u> .....                                                                                         | 110   |
| <u>Bibliographie</u> .....                                                                                       | 112   |



E R R A T A

Page 77, ligne 6, lire : ... comporte au moins chacune deux motifs différents car les traits ...

Page 77, ligne 11, lire : ... commun et au moins trois fois deux motifs différents, soit au total 6 motifs différents dont 3 antigéniques et 3 non révélés...

Page 81, lignes 10 et 11, lire : ... motif commun avec un minimum de deux motifs différents. A 77° C, elle comporte un motif commun avec un minimum de trois fois deux motifs différents, soit au total 6 motifs différents dont 3 antigéniques et 3 non révélés. Cette antigénicité nouvelle décroît à 87° C, puis à ...

